

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

10,088,078
04-5-06

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. November 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/095655 A2

(51) Internationale Patentklassifikation?: **C12N 15/82** (74) Anwalt: **PRESSLER, Uwe; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP03/04711**

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Mai 2003 (06.05.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 20 753.4 8. Mai 2002 (08.05.2002) DE
102 26 413.9 13. Juni 2002 (13.06.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **RENZ, Andreas [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str.6, 67117 Limburgerhof (DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str.56, 67063 Ludwigshafen (DE). STITT NIGEL, Marc [GB/DE]; Grosse Weinmeisterstr. 22a, 14469 Potsdam (DE). ZRENNER, Rita, Maria [DE/DE]; Storchenhof 6, 14476 Golm (DE). GEIGENBERGER, Peter [DE/DE]; Quartzstr. 12, 14129 Berlin (DE). VIGEOLAS, Helene [FR/DE]; Am alten Mörtelwerk 14, 14469 Potsdam (DE).**

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHODS FOR INCREASING OIL CONTENT IN PLANTS

WO 03/095655 A2

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERHÖHEN DES ÖLGEHALTES IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for increasing the oil content in plants, preferably in the seeds of plants, by expression of glycerol-3-phosphatdehydrogenases (G3PDH) from yeast, preferably from *Saccharomyces cerevisiae*. The invention also relates to expression constructs for the expression of G3PDH yeast in plants, preferably in the seeds of plants, transgenic plants expressing G3PDH, and to the use of said transgenic plants in the production of foodstuffs, feed, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals, especially in the production of oils.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, durch Expression von Glycerol-3-phosphatdehydrogenasen (G3PDH) aus Hefen, bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erfindung betrifft ferner Expressionskonstrukte zur Expression von Hefe G3PDH in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, transgene Pflanzen exprimierend Hefe G3PDH, sowie die Verwendung von besagter transgener Pflanzen zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere zur Herstellung von Ölen.

Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, durch Expression von Glycerol-3-phosphatdehydrogenasen (G3PDH) aus Hefen, bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erfindung betrifft ferner 10 Expressionskonstrukte zur Expression von Hefe G3PDH in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, transgene Pflanzen exprimierend Hefe G3PDH, sowie die Verwendung von besagter transgener Pflanzen zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere zur Herstellung von 15 Ölen.

Die Erhöhung des Ölgehalts in Pflanzen und insbesondere in Pflanzensamen ist für die klassische wie für die modernen Pflanzenzüchtung und insbesondere die pflanzliche Biotechnologie 20 von großem Interessen. Bedingt durch den steigenden Verbrauch von Pflanzenölen für Ernährung bzw. industrielle Anwendungen sind Möglichkeiten zur Steigerung bzw. Modifikation von Pflanzenölen zunehmend Gegenstand aktueller Forschung (z.B. Töpfer et al. (1995) Science 268:681-686). Ziel ist dabei insbesondere die 25 Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren in Samenölen.

Auch die aus den pflanzlichen Ölen erhältlichen Fettsäuren sind von besonderem Interesse. Sie kommen beispielsweise als Grundstoffe für Weichmacher, Schmierstoffe, Tenside, Kosmetika usw. 30 zum Einsatz oder werden in der Lebens- und Futtermittelindustrie als wertvoll Grundstoffe eingesetzt. So ist beispielsweise die Bereitstellung von Rapsölen mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge von besonderem Interesse, da diese besonderes in der Tensidherstellung begehrt sind.

35

Durch die gezielte Modulation pflanzlicher Stoffwechselwege mittels gentechnische Verfahren kann der pflanzlichen Metabolismus in einer Weise vorteilhaft verändert werden, die durch klassische Züchtungsmethoden nur über langwierige Schritte bzw. 40 überhaupt nicht zu erreichen wären. So werden ungewöhnliche Fettsäuren, beispielsweise bestimmte polyungesättigte Fettsäuren, nur in bestimmten Pflanzen bzw. überhaupt nicht in Pflanzen synthetisiert und können deshalb nur durch Expression des entsprechenden Enzyms in transgenen Pflanzen hergestellt werden 45 (z.B. Millar et al. (2000) Trends Plant Sci 5:95-101).

Triacylglyceride und andere Lipide werden aus Fettsäuren synthetisiert. Die Fettsäure- und Triacylglyceridbiosynthese lassen sich aufgrund der Kompartimentierung als getrennte Biosynthesewege, jedoch im Hinblick auf das Endprodukt, als ein Biosyntheseweg ansehen. Die Lipidsynthese kann dabei in zwei Teilmechanismen unterteilt werden, einen quasi "prokaryotischen" und einen quasi "eukaryotischen" (Browse et al. (1986) Biochemical J 235:25-31; Ohlrogge & Browse (1995) Plant Cell 7:957-970). Der prokaryotische Mechanismus ist in den Plastiden lokalisiert und umfasst die Biosynthese der freien Fettsäuren, die in das Cytosol exportiert werden, wo sie als Fettsäureacyl-CoA-Ester in den eukaryotischen Mechanismus eingehen und mit Glycerin-3-phosphat (G3P) zu Phosphatidsäure (PA) verestert werden. PA ist der Ausgangspunkt für die Synthese von neutralen und polaren Lipiden.

Die neutralen Lipide werden dabei über den Kennedy-Weg am Endoplasmatischen Reticulum synthetisiert (Voelker (1996) Genetic Engineering, Setlow (ed.) 18:111-113; Shankline & Cahoon (1998) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49:611-649; Frentzen (1998) Lipids 100:161-166). Neben der Biosynthese Triacylglyceriden dient G3P auch der Synthese von Glycerol (z.B. zur Osmoregulation und gegen Kältestress).

Das für die Synthese wesentliche G3P wird dabei durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) mittels der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH), auch als Dihydroxyacetonphosphat-reduktase bezeichnet, synthetisiert. Dabei fungiert in der Regel NADH als reduzierendes Cosubstrat (EC 1.1.1.8). Eine weitere Klasse von Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.5) verwendet FAD als Cosubstrat. Die Enzyme dieser Klasse katalysieren die Reaktion von DHAP zu G3P. In eukaryontischen Zellen sind die beiden Enzymklassen in unterschiedlichen Kompartimenten verteilt, wobei die NAD-abhängigen cytosolisch und die FAD-abhängigen mitochondrial lokalisiert sind (für *Saccharomyces cerevisiae* siehe z.B. Larsson et al., 1998, Yeast 14:347-357).

EP-A 0 353 049 beschreibt eine NAD-unabhängige G3PDH aus *Bacillus* sp. Auch in *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine NAD-unabhängige G3PDH identifiziert (Miyata K, Nagahisa M (1969) Plant Cell Physiol 10(3):635-643).

G3PDH ist ein essentielles Enzym in Prokaryoten und Eukaryoten, das neben der Funktion in der Lipidbiosynthese auch für die Aufrechterhaltung des zellulären Redoxstatus durch den Einfluss auf das NAD+/NADH Verhältnis mitverantwortlich ist. Die Deletion des GPD2 Gens in *Saccharomyces cerevisiae* (eine von zwei Isoformen der G3PDH in dieser Hefe) hat ein vermindertes Wachstum unter anaeroben Bedingungen zur Folge. Darüber hinaus scheint die G3PDH eine Rolle in der Stressantwort der Hefe v.a. gegen osmotischen

Stress zu spielen. Die Deletion des GPD1 Gens bedingt in *Saccharomyces cerevisiae* eine Hypersensitivität gegen Salz.

Sequenzen für G3PDHs wurden beschrieben für Insekten (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Cuphea lanceolata*), Säugern (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*), Fischen (*Salmo salar*, *Osmerus mordax*), Vögeln (*Ovis aries*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Algen und Bakterien.

10

Pflanzliche Zellen weisen mindestens zwei Isoformen der G3PDH auf, eine cytoplasmatische und eine plastidäre (Gee RW et al. (1988) *Plant Physiol* 86:98-103; Gee RW et al. (1988) *Plant Physiol* 87:379-383). Die enzymatische Aktivität der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase wurde bei Pflanzen erstmals in Kartoffelknollen festgestellt (Santora GT et al. (1979) *Arch Biochem Biophys* 196:403-411). Weitere zytosolisch und plastidär lokalisierte G3PDH Aktivitäten wurden in anderen Pflanzen wie Erbse, Mais oder Soja detektiert (Gee RW et al. (1988) *PLANT PHYSIOL* 86(1): 98-103). Beschrieben sind ferner G3PDHs aus Algen wie z.B. zwei plastidäre und einer zytosolische G3PDH-Isoform aus *Dunaliella tertiolecta* (Gee R et al. (1993) *Plant Physiol* 103(1):243-249; Gee R et al. (1989) *PLANT PHYSIOL* 91(1):345-351). Für die pflanzliche G3PDH aus *Cuphea lanceolata* wurde vorgeschlagen, durch Überexpression in Pflanzen eine Erhöhung des Ölgehaltes oder eine Verschiebung im Fettsäuremuster zu erreichen (WO 95/06733). Entsprechende Effekte konnten jedoch nicht belegt werden.

Bakterielle G3PDHs und ihre Funktion sind beschrieben (Hsu und Fox (1970) *J Bacteriol* 103:410-416; Bell (1974) *J Bacterial* 117:1065-1076).

WO 01/21820 beschreibt die heterologe Expression einer mutierten *E. coli* G3PDH für erhöhte Stresstoleranz und Änderung der Fettsäurezusammensetzung in Speicherölen. Die mutierte *E. coli* G3PDH (gpsA2FR) weist einen einzelnen Aminosäureaustausch auf, der eine veränderte Inhibition durch G3P bedingt. Die heterologe Expression der gpsA2FR Mutante führt zu Glycerolipiden mit einem erhöhten Anteil an C16-Fettsäuren und einem einhergehenden verminderten Anteil an C18-Fettsäuren. Die Veränderungen im Fettsäuremuster sind relativ gering: Ein Anstieg von 2 bis 5 % an 16:0 Fettsäuren und 1,5 bis 3,5 % bei 16:3 Fettsäuren, sowie eine Verminderung an 18:2 und 18:3 Fettsäuren um 2 bis 5 % wurde beobachtet. Der Gesamtgehalt als Glycerolipiden blieb unbeeinflusst.

Beschrieben sind ferner G3PDH aus Hefen (Ascomyceten) wie

- a) *Schizosaccharomyces pombe* (Pidoux AL et al. (1990) Nucleic Acids Res 18 (23): 7145; GenBank Acc.-No.: X56162; Ohmiya R et al. (1995) Mol Microbiol 18(5):963-73; GenBank Acc.-No.: D50796, D50797),
- b) *Yarrowia lipolytica* (GenBank Acc.-No.: AJ250328)
- c) *Zygosaccharomyces rouxii* (Iwaki T et al. Yeast (2001) 18(8):737-44; GenBank Acc.-No: AB047394, AB047395, AB047397) oder
- d) *Saccharomyces cerevisiae* (Albertyn J et al. (1994) Mol Cell Biol 14(6):4135-44; Albertyn J et al. (1992) FEBS LETT 308(2):130-132; Merkel JR et al. (1982) Anal Biochem 122 (1):180-185; Wang HT et al. (1994) J Bacteriol. 176(22):7091-5; Eriksson P et al. (1995) Mol Microbiol. 17(1):95-107; GenBank Acc.-No.: U04621, X76859, Z35169).
- e) *Emericella nidulans* (GenBank Acc.-No.: AF228340)
- f) *Debaryomyces hansenii* (GenBank Acc.-No.: AF210060)

Es stellte sich daher die Aufgabe alternative Verfahren zur Erhöhung des Ölgehaltes in Pflanzen bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zum Erhöhen des Gesamtölgehalt in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, umfassend

- a) transgene Expression einer Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe in besagtem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben und
- b) Auswahl von pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - der Gesamtölgehalt in dem besagten pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben erhöht ist.

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die samenspezifische heterologe Expression des Hefeproteins Gpd1p (G3PDH aus *Saccharomyces cerevisiae*; SEQ ID NO: 2) in *Arabidopsis*-Samen zu einer signifikanten Erhöhung des Gehalts an Triacylglyceriden (Speicheröle) führt. Der Ölgehalt wurde dabei um etwa 22 %, in einer transgenen Linie sogar um 41 %, verglichen mit Wildtyp-

5

Kontrollpflanzen gesteigert (siehe Fig. 1). Die transgene Expression der Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase aus Hefe zeigte keine nachteiligen Effekte auf das Wachstum oder andere Eigenschaften der transformierten Pflanzen.

- 5 Da G3PDH ein Schlüsselenzym der Biosynthese in allen pflanzlichen Organismen ist, kann das erfindungsgemäße Verfahren im Prinzip auf alle Pflanzenarten - neben der als Modelpflanze eingesetzten Art *Arabidopsis thaliana* - angewendet werden. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren auf Ölpflanzen angewendet, die
10 bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industriellen Gewinnung von Ölen verwendet werden.

"Pflanzlicher Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben" meint allgemein jeden ein oder mehrzelligen Organismus oder ein Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) desselben, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und
20 dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen.

- 25 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und
30 andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungs-
35 stadium.

"Pflanze" umfasst alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen *Cucurbita*, *Rosa*, *Vitis*,
40 *Juglans*, *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solarium*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*,
45 *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Heterocallis*, *Nemesis*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*,

Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiateae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

10

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt aus dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

25 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,

- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,

35 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,

- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

40

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterkategorie Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,

45 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine)

und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Pfeffer) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,

10

- Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie)) und andere mehr;

15 sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Insbesondere bevorzugt ist Synechocystis.

40

Am meisten bevorzugt sind Ölpflanzen. Ölpflanzen meint Pflanzen, die bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industriellen Gewinnung von Ölen verwendet werden. Diese Pflanzen können einen hohen Ölgehalt und/oder aber eine besondere, industriell interessante Fettsäurezusammensetzung aufweisen. Bevorzugt sind Pflanzen, die einen Lipidanteil von mindestens 1 Gew.-% aufweisen. Ölpflanzen umfassen beispielhaft:

Borago officinalis (Borretsch); Brassica Arten wie *B. campestris*, *B. napus*, *B. rapa* (Senf, Raps oder Rübsel); Cannabis sativa (Hanf); Curthamus tinctorius (Färberdiestel); Cocos nucifera (Kokosnuss); Crambe abyssinica (Krambe); Cuphea Arten (Cuphea 5 Arten liefern Fettsäuren von mittlerer Kettenlänge insbesondere für industrielle Anwendungen); Elaeis guinensis (Afrikanische Ölpalme); Ekeis oleiferu (Amerikanische Ölpalme); Glycine max (Sojabohne); Gossypium hirsutum (Amerikanische Baumwolle); Gossypium barbadense (Ägyptische Baumwolle); Gossypium herbaceum 10 (Asiatische Baumwolle); Helianthus annus (Sonnenblume); Linum usitatissimum (Lein oder Flachs); Oenethem biennis (Nachtkerze); Ozea europea (Olive); Oryza sativa (Rice); Ricinus communis (Castor); Sesamum indicum (Sesam); Triticum Arten (Weizen); Zea maize (Mais) sowie verschiedene Nussarten wie beispielsweise 15 Walnuss oder Mandel.

"Gesamtölgehalt" meint die Summe aller Öle, bevorzugt die Summe die Triacylglyceride.

20 "Öle" umfasst neutrale und/oder polare Lipiden und Mischungen derselben. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 aufgeführten zu nennen.

Tab. 1: Pflanzliche Lipidklassen

25

	Neutrale Lipide	Triacylglycerol (TAG)
		Diacylglycerol (DAG)
		Monoacylglycerol (MAG)
30	Polare Lipide	Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)
		Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)
		Phosphatidylglycerol (PG)
		Phosphatidylcholine (PC)
		Phosphatidylethanolamine (PE)
		Phosphatidylinositol (PI)
35		Phosphatidylserin (PS)
		Sulfoquinovosyldiacylglycerol

Neutrale Lipide meint bevorzugt Triacylglyceride. Sowohl die 40 neutralen als auch die polaren Lipide können ein breites Spektrum an verschiedenen Fettsäuren enthalten. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 2 aufgeführten Fettsäuren zu nennen.

Tab. 2: Übersicht über verschiedene Fettsäuren (Auswahl)

1 Kettenlänge: Anzahl der Doppelbindungen

* nicht natürlicherweise in Pflanzen vorkommend

	Nomenklatur ¹	Name
5	16:0	Palmitinsäure
	16:1	Palmitoleinsäure
	16:3	Roughaninsäure
	18:0	Stearinsäure
10	18:1	Ölsäure
	18:2	Linolsäure
	18:3	Linolensäure
	γ -18:3	Gamma-Linolensäure*
	20:0	Arachidinsäure
15	22:6	Docosahexanonsäure (DHA) *
	20:2	Eicosadienonsäure
	20:4	Arachidonsäure (AA) *
	20:5	Eicosapentaenosäure (EPA) *
	22:1	Erucasäure

20 Öle meint bevorzugt Samenöle.

"Erhöhung" des GesamtÖlgehaltes meint die Steigerung des Gehaltes an Ölen in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe oder Organ derselben, bevorzugt in den Samenorganen der Pflanze. Dabei ist

25 der Ölgehalt im Vergleich zu einer nicht dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfenen, aber ansonsten unveränderten Ausgangspflanze unter ansonsten gleichen Rahmenbedingungen um mindestens 5 %, bevorzugt mindestens 10 %, besonders bevorzugt mindestens 15 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 20 %, am meisten **30** bevorzugt mindestens 25 % erhöht. Rahmenbedingungen meint dabei alle für die Keimung, Kultivierung oder Wachstum der Pflanze relevanten Bedingungen wie Boden-, Klima- oder Lichtverhältnisse, Düngung, Bewässerung, Pflanzenschutzmaßnahmen usw.

35 "Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase aus Hefe" (infolge "Hefe G3PDH") meint allgemein all solche Enzyme, die in der Lage sind, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerol-3-phosphat (G3P) - bevorzugt unter Verwendung eines Cosubstrates wie NADH - umzusetzen und natürlicherweise in einer Hefe exprimiert werden.

40

Hefen meint eine die Gruppe einzelliger Pilze mit ausgeprägter Zellwand und Bildung von Pseudomyzel (im Ggs. zu Schimmelpilzen). Ihre Vermehrung erfolgt vegetativ durch Sprossung und/oder Spaltung (Schizosaccharomyces bzw. Saccharomyces).

45

10

Umfassst sind sogenannte unechte Hefen, und zwar bevorzugt die Familien Cryptococcaceae, Sporobolomycetaceae mit den Gattungen *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Pityrosporum*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Trigonopsis*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* bzw. *Sporobolomyces* und *Bullera*, sowie echte Hefen (Hefen mit auch geschlechtlicher Vermehrung; Ascus), und zwar bevorzugt die Familien Endo- u. Saccharomycetaceae, mit den Gattungen *Saccharo-*, *Debaro-*, *Lipomyces*, *Hansenula*, *Endomycopsis*, *Pichia*, *Hanseniaspora*. Am meisten bevorzugt sind die Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Yarrowia lipolytica*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus nidulans*, *Debaryomyces hansenii* und *Torulaspora hansenii*.

15 Hefe G3PDH meint insbesondere Polypeptide die als "wesentlichen Eigenschaften" nachfolgende Eigenschaften aufweisen:

- a) die Umsetzung von Dihydroxyacetophosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat (EC 1.1.1.8),
20 und
 - b) eine Peptidsequenz umfassend mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
- | | | |
|-----------|----------------------------------|-----------------|
| 25 | i) GSGNWGT(A/T)IAK | (SEQ ID NO: 22) |
| | ii) CG(V/A)LSGAN(L/I/V)AXE(V/I)A | (SEQ ID NO: 26) |
| | iii) (L/V)FXRPYFXV | (SEQ ID NO: 27) |

bevorzugt ist das Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe
30 bestehend aus

iv)	GSGNWGTIAKV(V/I)AEN	(SEQ ID NO: 29)
v)	NT(K/R)HQNVKYLP	(SEQ ID NO: 30)
vi)	D(I/V)LVFN(I/V)PHQFL	(SEQ ID NO: 31)
35	vii) RA(I/V)SCLKGFE	(SEQ ID NO: 32)
	viii) CGALSGANLA(P/T)EVA	(SEQ ID NO: 33)
	ix) LFHRPYFHV	(SEQ ID NO: 34)
	x) GLGEII(K/R)FG	(SEQ ID NO: 35)

40 besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2 oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive i), ii) und iii) oder ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive iv), v), vi), vii), viii), ix) und xiv). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Aminosäuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

11

Weiterhin kann eine Hefe G3PDH optional - zusätzlich zu mindestens einem der oben genannten Sequenzmotive i) bis x) - weitere Sequenzmotive umfassen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

5

xi) H(E/Q)NVKYL (SEQ ID NO: 23)

xii) (D/N) (I/V) (L/I)V(F/W) (V/N) (L/I/V) PHQF(V/L/I) (SEQ ID NO: 24)

xiii) (A/G) (I/V) SC(L/I)KG (SEQ ID NO: 25)

10 xiv) G(L/M) (L/G)E(M/I) (I/Q) (R/K/N)F(G/S/A) (SEQ ID NO: 28)

Am meisten bevorzugt meint Hefe G3PDH das Hefeproteins Gpd1p gemäß SEQ ID NO: 2, sowie funktionelle Äquivalente als auch funktionell äquivalente Teile der vorgenannten.

15

Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen des Hefeproteins Gpd1p gemäß SEQ ID NO: 2 sowie homologe Polypeptide aus anderen Hefen, die die gleichen wesentlichen Eigenschaften einer Hefe G3PDH, entsprechend

20 oben gegebener Definition, aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Insbesondere Bevorzugt sind die Polypeptide beschrieben durch SEQ ID NO: 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 38 oder 40.

25

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung vorteilhaft einzusetzenden Hefe G3PDH können durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken - unter Verwendung der beispielhaft aufgeführten Hefe G3PDH-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder der für 30 dieses kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 60 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %,

35 besonders bevorzugt mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu dem Protein mit der SEQ ID NO: 2.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die gesamte Sequenzlänge verstanden, 40 die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

45 Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

12

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit 5 obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist. Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 60 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 10 90 % zu der Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 1 haben.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des 15 Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20 Gap Weight: 50 Length Weight: 3

Average Match: 10 Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie 25 von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

30 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Hefe G3PDH aufweisen.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen, meint aber bevorzugt stringent Hybridisierungsbedingungen. Solche 40 Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Bei 45 spielhaft können die Bedingungen während des Waschschrifftes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC:

13

0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskonstrukte, die eine transgene Expression einer Hefe G3PDH, in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil Zellen oder Vermehrungsmaterial des

10 besagten pflanzlichen Organismus gewährleisten können.

Für die Hefe G3PDH gilt dabei die oben genannte Definition, besonders bevorzugt ist die transgene Expression einer Hefe G3PDH beschrieben durch die Sequenz mit der SEQ ID NO: 2.

15

In besagten transgenen Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für eine Hefe G3PDH bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine 20 Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsmaterial desselben gewährleistet.

Insbesondere bevorzugt sind transgene Expressionskassetten, wobei 25 die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase beschrieben ist durch

a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 oder

30

b) eine Sequenz, die sich entsprechend dem degenerierten genetischen Code von einer Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 ableitet, oder

35 c) eine Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % zu der Sequenz mit der SEQ ID NO: 1 aufweist.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu 40 exprimierenden Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu 45 ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter ent-

fernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide 5 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

10

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer transgenen Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und 15 Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, 20 Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymeschnittstellen oder eines 25 Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein 30 pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer transgenen Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH so hinter einen endogenen, 35 pflanzlichen Promotor platziert wird, das dieser die Expression der Hefe G3PDH bewirkt.

Bevorzugt werden in den transgenen Expressionskassetten Promotoren eingesetzt, die in einem pflanzlichen Organismus 40 oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsmaterial desselben funktionell sind. In pflanzlichen Organismen funktionelle Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. 45 Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

5 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise
10 verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986)
15 Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)" -Promotor
20 (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor
25 (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter- einheiten, den Promotor des Nitrilase-1 Gens aus Arabidopsis
30 thaliana (GenBank Acc.-No.: U38846, Nukleotide 3862 bis 5325 oder alternativ 5342) oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Besonders bevorzugt sind der CaMV
35 35S-Promotor und der Nitrilase-1 Promotor aus Arabidopsis thaliana.

b) Gewebespezifische Promotoren

40 Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für Samen, wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196- 12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta

16

199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980).

Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

20
c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden. Ferner geeignet ist der Promotor des Glutathione-S-transferase Isoform II Gens (GST-II-27), der durch exogen applizierte Safener wie z.B. N,N-Diallyl-2,2-dichloroacetamid aktiviert werden kann (WO 93/01294) und in zahlreichen Geweben von sowohl Monokotyledonen als auch Dikotyledonen funktionell ist.

Besonders bevorzugt sind konstitutive sowie ganz besonders bevorzugt samenspezifische Promotoren, insbesondere der Napin-45 und der USP-Promotor.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als 5 Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

- Die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können 10 mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzenspezifischen 15 Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.
- 20 25 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionsteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren 30 erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wassersstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.
- 35 Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren 40 Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von 45 Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116,

Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

10

Die transgene Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

15

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

20

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine dsRNA kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine transgene Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten transgenen Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten,

Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxido-reduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonlharnstoff-Herbicide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Grosskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luciferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β-Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die β-Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionsskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin

of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5

- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

10 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxy-15 glucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

20 Zusätzlich kann besagte transgene Expressionskassette oder Vektoren weitere Nukleinsäuresequenzen enthalten, die nicht für eine Hefe G3PDH kodieren, und deren transgene Expression zu einer zusätzlichen Steigerung der Fettsäure-Biosynthese führt (infolge proOIL). Diese zusätzlich transgen exprimierte proOIL Nuklein-säuresequenz kann beispielhaft aber nicht einschränkend ausge-wählt sein aus Nukleinsäuren kodierend für Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAT), Lysophos-phatidat-Acyltransferase (LPAT), Diacylglycerol-Acyltransferase (DAGAT) und Phospholipid:diacylglycerol-acyltransferase (PDAT). 25 Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt und aus Daten-banken oder entsprechenden cDNA-Banken der jeweiligen Pflanzen leicht zugänglich.

30 Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressions-kassetten enthalten sind. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher besagte transgene Vektoren, die eine transgene 40 Expressionskassette für eine Hefe G3PDH umfassen.

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Die Expressionskassette kann in 45 den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Der entstandene Vektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt trans-

formierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind solche 5 Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene pflanzliche Organismen oder Gewebe, Organ, Teil, Zellen oder 10 Vermehrungsgut desselben, die eine Hefe G3PDH entsprechend oben gegebener Definition, eine transgene Expressionskassette für eine Hefe G3PDH oder einen transgenen Vektor umfassend eine solche Expressionskassette enthalten.
- 15 Die Herstellung eines entsprechenden transgenen pflanzlichen Organismus erfolgt z.B. mittels Transformation oder Transfektion mittels der entsprechenden Proteine oder Nukleinsäuren. Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende 20 DNA (z.B. der Expressionsvektor), RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann 25 die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch 30 Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Möglich sind ferner das Quellen von 35 Pflanzenteilen in DNA-Lösungen sowie Pollen- oder Pollenschlauchtransformation. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl 40 Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular 45 Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

22

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzen-geweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Trans-formation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Proto-

5 plastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

10

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Trans-formation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes und Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden

15 durch oder durch Infektion mit transgenen Pflanzenviren durch-geföhrt werden. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

20

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischen-vektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation 25 verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

30 Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium 35 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein 40 Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Über-tragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanz-licher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und 45 beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren

sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignet Promotoren sind 5 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden 10 Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen 15 regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von 20 untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). 25 Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbicides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiele sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid 30 Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von trans- 35 formierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

40 Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus 45 (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorgezugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans-

formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann 5 eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt 10 und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind such Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) 15 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Hefe G3PDH Nuklein- 20 säuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte G3PDH Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder 25

- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH, oder
- b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein in 30 pflanzlichen Organismen funktioneller Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden 35 oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus 40 oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 45 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise

die natürlich vorkommende Kombination des Promotors eines Gens kodierend für eine Hefe G3PDH mit dem entsprechenden Hefe G3PDH-Gen wird zu einer transgenen Expressionsskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie 5 beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangs-
10 organismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches, insbesondere Pflanzen, die für die Gewinnung von Ölen verwendet werden wie beispielsweise Raps, Sonnenblume, 15 Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja, Mais, Weizen und Nussarten. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des 20 Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion 25 von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleiteten Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei 30 transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere von Ölen, Fetten, Fettsäuren oder Derivaten der vorgenannten.

35 Neben der Beeinflussung des Ölgehaltes kann die transgene Expression einer Hefe G3PDH in Pflanzen noch weitere vorteilhafte Effekte vermitteln, wie beispielsweise eine erhöhte Stressresistenz z.B. gegen osmotischen Stress. Die Hefe G3PDH 40 vermittelt über erhöhte Glycerolspiegel einen Schutz gegen derartigen Stress, indem Glycerol als Osmoprotektivum wirkt. Derartiger osmotischer Stress tritt beispielsweise bei salzhaltigen Böden und Wasser auf und ist ein zunehmendes Problem in der Landwirtschaft. Eine erhöhte Stresstoleranz bietet hier beispielsweise die Möglichkeit zur landwirtschaftlichen Nutzung von 45 Flächen, in denen übliche Ackerpflanzen nicht gedeihen können.

26

Ferner kann die transgene Expression der Hefe G3PDH den NADH Spiegel und so das REDOX-Gleichgewicht in dem pflanzlichen Organismus beeinflussen. Stress, wie beispielsweise Trockenheit, Hitze, Kälte, UV Licht etc. kann zu erhöhten NADH Spiegeln und zu einer vermehrten Bildung von reaktivem Sauerstoff (ROS) führen.
5 Die transgene Expression der Hefe G3PDH kann einen unter besagten Stressbedingungen anfallenden NADH Überschuss abbauen, so das REDOX-Gleichgewicht stabilisieren und die Auswirkungen des Stress mildern.

10**15****20****25****30****35****40****45**

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae*
5 G3PDH (Gpd1p)
2. SEQ ID NO: 2
Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH
(Gpd1p)
10
3. SEQ ID NO: 3
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae*
G3PDH (Gpd2p)
15
4. SEQ ID NO: 4
Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH
(Gpd2p)
5. SEQ ID NO: 5
20 Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH
(Gpd2p) mit zweitem, alternativem Start-Codon
6. SEQ ID NO: 6
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe*
25 G3PDH
25
7. SEQ ID NO: 7
Proteinsequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe* G3PDHD
30
8. SEQ ID NO: 8
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe*
G3PDH
35
9. SEQ ID NO: 9
Proteinsequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe* G3PDH
40
10. SEQ ID NO: 10
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH
45
11. SEQ ID NO: 11
Proteinsequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH
45
12. SEQ ID NO: 12
Proteinsequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH, mit
zweitem, alternativem Start-Codon
45

13. SEQ ID NO: 13
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii*
G3PDH
- 5 14. SEQ ID NO: 14
Proteinsequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
15. SEQ ID NO: 15
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii*
10 G3PDH
16. SEQ ID NO: 16
Proteinsequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
- 15 17. SEQ ID NO: 16
Expressionsvektor auf Basis von pSUN-USP für *S.cerevisiae*
G3PDH (Gpd1p; Insert von bp 1017 - 2190)
18. SEQ ID NO: 18 Oligonukleotidprimer ONP1
20 5'-ACTAGTATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3'
19. SEQ ID NO: 19 Oligonukleotidprime ONP2
5'-CTCGAGATCTTCATGTAGATCTAATT-3'
- 25 20. SEQ ID NO: 20 Oligonukleotidprime ONP3
5'-GC GGCCGCCATGTCTGCTGCTGATAG-3'
21. SEQ ID NO: 21 Oligonukleotidprime ONP4
5'-GC GGCCGCATCTTCATGTAGATCTAATT-3'
- 30 22-35: SEQ ID NP 22 bis 35: Sequenzmotive für Hefe G3PDHs mit
Angabe von möglichen Sequenzvariationen. Die Variationen
eines einzelnen Motives können jeweils einzeln aber auch
in den unterschiedlichen Kombinationen miteinander vor-
kommen.
- 35 36. SEQ ID NO: 36
Expressionsvektor pGPTV-gpd1 auf Basis von pGPTV-Napin für
S.cerevisiae G3PDH (Gpd1p; Insert gdp1 von bp 11962-13137;
40 nos-Terminator: 13154-13408; Napin-Promotor: 10807-11951).
37. SEQ ID NO: 37
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Emericella nidulans* G3PDH
- 45 38. SEQ ID NO: 38
Aminosäuresequenz kodierend für *Emericella nidulans* G3PDH

39. SEQ ID NO: 39

Nukleinsäuresequenz kodierend für Debaryomyces hansenii G3PDH
(partiell)

5 40. SEQ ID NO: 40

Aminosäuresequenz kodierend für Debaryomyces hansenii G3PDH
(partiell)

Abbildungen

10

Fig. 1: Ölgehalt in transgenen GPD1p-Linien

15 Messung des TAG-Gehalts in T2 Samen von transgenen Arabidopsis-Linien mit dem Gpd1p-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (G2 bis G30). Zum Vergleich ist der Gehalt in entsprechenden untransformierten (Wilttyp-Pflanzen; W1 bis W10) bestimmt worden. Es wurden 8 Arabidopsis-Linien mit einem signifikant gesteigertem Ölgehalt identifiziert. Die angegebenen Fehlerabweichung ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Messungen.

20

Fig. 2: Bestimmung des Ölgehalts in Samen der T3 Generation.

25 Wiedergegeben ist der Ölgehalt (in mg Lipid pro g Trockengewicht (DW)) einzelner Arabidopsis-Linien. Jede Säule stellt den Mittelwert aus 6 individuellen Pflanzen pro unabhängiger Linie dar. Von jeder Pflanze wurde eine dreifach Bestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung über alle Werte. Die Kontrollpflanzen sind mit 'col' bezeichnet. Die Einzelwerte sind numerisch zusätzlich in folgender Wertetabelle wiedergegeben (die Kontrolle wurde auf 100% Ölgehalt gesetzt):

35

40

45

Linien	Ölgehalt (mg/g)	STD	Rel. Anstieg in %
col	278,1	12,2	100
#11	304,6	18,3	110
#12	301,4	19,0	108
#13	275,2	89,7	99
#21	323,2	77,0	116
#24	268,9	15,1	97
#25	293,6	23,0	106
#27	285,6	18,4	103
#41	316,1	19,1	114
#53	260,3	16,4	94
#67	292,0	13,8	105
#71	244,1	11,6	88
#82	295,6	16,8	106

30

Linien mit einem statistisch signifikant erhöhtem Lipidgehalt (Linien #11, #21, #41 und #67) sind mit schwarzen Balken präsentiert.

5 Fig. 3: Bestimmung der Aktivität von G3PDH in der Kontrolle (,col') und den gdpl transformierten Pflanzen.

Die G3PDG Aktivität der einzelnen Linien wurde wie in Beispiel 8 beschrieben bestimmt und ist in nmol G3P pro 10 Minute und g Feuchtgewicht (FW) wiedergegeben.

	G3PDH Aktivität	STD
col	6,68337432	0,71785229
#11	11,8958635	1,67941604
#12	9,14226124	2,25411878
#13	8,8210768	2,19519777
#21	9,88435444	1,04798566
#24	5,89378595	1,26005769
#25	5,14179348	1,22845409
#27	6,77303725	3,22220935
#41	20,8325636	5,42018531
#53	7,45794947	2,25573816
#67	12,7670015	0,74678353
#71	9,04748534	1,59829185
#82	9,37260033	2,1356558

25 Linien mit einer statistisch signifikant erhöhten G3PDH-Aktivität (Linien #11, #21, #41 und #67) sind mit schwarzen Balken präsentiert. Es ist erkennbar, dass eine erhöhte G3PDG Aktivität mit einem erhöhten Lipidgehaltr korreliert.

30

Beispiele

Allgemeine Methoden:

35 Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, stammen von den Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Molekularbiologie-Kits wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Qiagen (Hilden), Stratagen (Amsterdam, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe) und Ambion (Cambridgeshire, United Kingdom). Die verwendeten Reagenzien wurden entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungs-
5 schritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nuklein-säuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter
10 DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA
15 74:5463-5467).

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* repräsentiert ein Mitglied der höheren Pflanzen (Samenpflanzen). Diese Pflanze ist eng verwandt mit anderen Pflanzenarten aus der Familie der Cruciferen wie z.B. *Brassica napus*, aber auch mit anderen Pflanzenfamilien der Dikotyledonen. Aufgrund des hohen Grades an Homologie ihrer DNA-Sequenzen bzw. Polypeptidsequenzen kann *Arabidopsis thaliana* 25 als Modellpflanze für andere Pflanzenarten eingesetzt werden.

a) Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen

Die Pflanzen werden entweder auf Murashige-Skoog Medium
30 mit 0,5 % Saccharose (Ogas et al. (1997) Science 277:91-94) oder auf Erde gezogen (Focks & Benning (1998) Plant Physiol 118:91-101). Um einheitliche Keimungs- und Blühzeiten zu erreichen, werden die Samen nach Ausplattieren bzw. Ausstreuen auf Erde zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Nach
35 der Blüte werden die Schoten markiert. Entsprechend der Markierungen werden dann Schoten mit einem Alter von 6 bis 20 Tagen nach der Blüte geerntet.

Beispiel 2: Klonierung des *Gpd1*-Gens aus Hefe

40 Genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288C (Mat alpha SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde nach folgendem Protokoll isoliert:

45 Eine 100 ml Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 30°C angezogen. Davon wurden 60 ml abzentrifugiert bei 3000 xg für 3 min. Das Pellet wurde in 6 ml doppelt-destilliertem H₂O

32

resuspendiert und auf 1,5 ml Gefäße verteilt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit 200 µl Lösung A, 200 µL Phenol/Chloroform (1:1) und 0,3 g Glaskugeln durch Vor-
texen resuspendiert und lysiert. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer
5 pH 8,0 wurde für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ethanolfällung mit 1 ml Ethanol unterzogen. Das erhaltene Pellet nach Fällung wurde in 400 µL TE-Puffer pH 8,0 + 30 µg/mL RNaseA gelöst. Nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurden 18 µL 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 und 1 mL Ethanol zugegeben und die 10 präzipitierte DNA durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 25 µL doppelt-destilliertem H₂O gelöst. Die Konzentration der genomischen DNA wurde durch deren Absorption bei 260 nm bestimmt.

15 Lösung A:

2 % Triton-X100

1 % SDS

0,1 M NaCl

0,01 M Tris-HCl pH 8,0

20 0,001 M EDTA

Für die Klonierung des Gpd1-Gens wurde die isolierte Hefe-DNA in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidprimern ONP1 und ONP2 eingesetzt.

25

ONP1: 5'-ACTAGTATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3' (SEQ ID NO: 18)

ONP2: 5'-CTCGAGATCTTCATGTAGATCTAATT-3' (SEQ ID NO: 19)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

30

5,00 µL 5 µg genomische Hefe-DNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl₂

5,00 µL 2 mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/uL)

35 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

PCR-Programm:

40 Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschließende Extension von 5 min bei 72°C.

Das PCR-Produkte wurde in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen)

45 gemäß Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem Vektor pCR2.1-gpd1 und die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft.

Für die Klonierung in den Agrotransformationsvektor pGPTV wurden 0,5 µg des Vektors pCR2.1-gpd1 mit dem Restriktionsenzym XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunde inkubiert und anschließend 15 min mit Klenow-Fragment (New England Biolabs) inkubiert. Nach 5 Inkubation für 2 Stunden mit SpeI wurden die DNA-Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das neben dem Vektor (3,9 kb) 1185 bp große Fragment der gpd1-Sequenz wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "Gelpurification"-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer 10 eluiert. 0,1 µg des Vektors pGPTV wurde zuerst für 1 Stunde mit dem Restriktionsenzym SacI verdaut, dann für 15 min mit Klenow-Fragment (New England Biolabs) inkubiert. 10 µL des Eluates des gpd1-Fragments und 10 ng des behandelten Vektors pGPTV wurden über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase von New England Biolabs). 15 Die Ligationprodukte werden dann in TOP10 Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert, resultierend in dem Vektor pGPTV-gpd1. Positive Klone werden mit den Primern ONP1 und ONP2 durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

20

Für die Herstellung des Vektors pSUN-USP-gpd1 wurde eine PCR vom Vektor pCR2.1-gpd1 mit den Primern ONP3 und ONP4 durchgeführt.

ONP3: 5'-GC GGCCGCCATGTCTGCTGCTGATAG-3' (SEQ ID NO: 20)

25 ONP4: 5'-GC GGCCGCATCTCATGTAGATCTAATT-3' (SEQ ID NO: 21)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

30 5 ng DNA Plasmid pCR2.1-gpd1
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl₂
5,00 µL 2 mM dNTP
1,25 µL je Primer (10 pmol/uL)
0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

35

PCR-Programm:

Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschließende Extension von 5 min bei 72°C.

40

Das 1190 bp große PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym NotI für 24 Stunden verdaut. Der Vektor pSUN-USP wurde für 2 Stunden mit NotI verdaut, dann 15 min mit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) inkubiert. 100 ng des vor 45 behandelten gpd1-Fragments und 10 ng des behandelten Vektors pGPTV wurden über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase von New England Biolabs). Die Ligationprodukte werden dann in TOP10

34

Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert, resultierend in dem Vektor pSUN-USP-gpd1. Positive Klone werden mit den Primern ONP3 und ONP4 durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

5

Beispiel 3: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 10 66: 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

15

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden.

Ein weiteres Beispiel für binäre Vektoren ist der Vektor pSUN-USP und pGPTV-Napin in welche das Fragment aus Beispiel 2 kloniert wurde. Der Vektor pSUN-USP enthält den USP-Promotor sowie den OCS Terminator. Der Vektor pGPTV-Napin enthält einen verkürzte Version des Napin-Promotors und den nos-Terminator.

30 Die Fragmente aus Beispiel 2 wurden in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pSUN-USP bzw. pGPTV-Napin kloniert, um die samenspezifische Expression des gdp1 Genes zu ermöglichen. Das entsprechende Konstrukt pSUN-USP-gpd1 ist mit der SEQ ID NO: 17 beschrieben, das Konstrukt von G3PDH in pGPTV-Napin (pGPTV-gpd1) 35 ist durch SEQ ID NO: 36 beschrieben.

Beispiel 4: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung der Agrobacterium tumefaciens-Stämme 40 GV3101 (pMP90) (Koncz und Schell (1986) Mol Gen Genet 204: 383-396) oder LBA4404 (Clontech) durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al. (1984) Nucl Acids Res 13:4777-4788).

45

Beispiel 5: Pflanzentransformation

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-techniken durchgeführt werden (Gelvin SB, Schilperoort R, Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick BR, Thompson JE, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Die Transformation mittels Agrobacterium von *Arabidopsis thaliana* wurde durch die Methode nach Bechthold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 316, 1194-1199) durchgeführt.

15

Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyl-transformation transformiert werden (Moloney et al. (1989) Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al. (1989) Plant Physiol 91: 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Raps-selektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

25 Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen. Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 30 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchen-35 beschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

40 Beispiel 6: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der 45 Translationsebene gemessen.

36

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt

5 (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so

10 dass, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der

15 Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

20

Northern-Hybridisierung:

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit

25 einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und

30 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von

35 alpha-³²P-dCTP (Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS,

40 bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie

45 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-

Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer 5 chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

10 Beispiel 7: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Ver- 15 bindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Kompo- nenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. 20 von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analyse- techniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie 25 (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon A et al. (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: 30 "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter PA et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy JF und Cabral JMS (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz JA und Henry JD (1988) Biochemical 35 Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

40 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben 45 bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide -

Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

5

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die 10 Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während 15 der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin 20 angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, 30 wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

35 Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C 40 erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und 45 schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min

und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

5

Für die quantitative Öl-Analyse der mit dem Gpd1-Gen transformierten *Arabidopsis* Pflanzen wurde folgendes Protokoll angewendet:

- 10 Die Extraktion der Lipide aus Samen wird nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) Can J Biochem Physiol 37:911 durchgeführt. Dazu werden 5 mg *Arabidopsis* Samen in 1,2 ml Qiagen-Microtubes (Qiagen, Hilden) auf einer Sartorius (Göttingen) Mikrowaage abgewogen. Das Samenmaterial wird mit 500 uL Chloroform/Methanol (2:1; enthält Mono-C17-glycerin von Sigma als internen Standard) in der Rätschmühle MM300 der Firma Retsch (Haan) homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 uL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 erfolgt die Phasentrennung. Von der organischen Phase werden 50 µL abgenommen, mit 1500 uL Chloroform verdünnt und 5 µL auf die Kapillaren Chromarods SIII der Firma Iatroskan (SKS, Bechenheim) aufgetragen. Nach Auftrag der Proben werden diese für 15 min in einer Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 6:2:2 Chloroform: Methanol: Toluol in einem ersten Schritt aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit werden die Kapillaren 25 4 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 22 min in eine Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 7:3 n-Hexan:Diethyl-ether gestellt. Nach einem weiteren Trocknungsschritt für 4 min bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Iatroskan MK-5 (SKS, Bechenheim) entsprechend Fraser & Taggart, 1988 J.
30 Chromatogr. 439:404 analysiert. Folgende Parameter wurden für die Messungen eingestellt: Slice width 50 msec, Threshold 20 mV, Noise 30, Skim ratio 0. Die Quantifizierung der Daten erfolgte anhand des internen Standards Mono-C17-glycerin (Sigma) sowie einer erstellten Eichkurve mit Tri-C17-glycerin (Sigma) mittels
35 des Programms ChromStar (SKS, Beichenheim).

- Für die quantitative Bestimmung der Ölgehalte wurden T2 Samen von mehreren, unabhängigen transgenen Linien mit den Konstrukten pSUN-USP-gpd1 bzw. pGPTV-gpd1 analysiert. Von den Samenpools
40 jeder Linie wurden drei unabhängige Extraktionen durchgeführt und die Extrakte unabhängig gemessen. Aus den drei unabhängigen Messungen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

- 45 Das Ergebnis der Messungen für die Linien mit dem Konstrukt pGPTV-gpd1 zeigte einen signifikant höheren Ölgehalt in mehreren (10) transgenen Linien (Fig. 1), verglichen mit den Messungen

von 10 Wildtyp-Pflanzen. Für das Konstrukt pSUN-USP-gpd1 werden ähnliche Ölgehalte gemessen (nicht gezeigt).

Der durchschnittliche Ölgehalt der oben aufgeführten Linien
5 beträgt $34,86 \pm 1,56\%$, während der Durchschnitt der Wildtyp-
pflanzen bei $27,75 \pm 2,64\%$ liegt. Dies entspricht einer
Steigerung des Ölgehalts um absolut 7,1% (relativ 25,6%).

Zur Kontrolle der Vererbbarkeit des Effektes von gpd1 (Steigerung
10 des Ölgehaltes) wurden T2 Samen von den Linien mit erhöhten Ölge-
halten sowie von Linien mit unverändertem Ölgehalt angezogen. Je-
weils 6 Pflanzen pro Linien wurden ausgebracht und die Samen auf
Ölgehalt und Enzymaktivität überprüft. Die Bestimmung der Ölge-
halte erfolgte entsprechend der oben ausgeführten Methodik. Die
15 erhaltenen Werte sind in Fig. 2 dargestellt. Als Kontrollen die-
nen Col-0 und C24 Arabidopsis Ecotypen. C24 ist dabei ein Ecotyp,
der sich durch einen höheren Ölgehalt als Col-0 auszeichnet. Es
konnten Linien charakterisiert werden, die einen erhöhten Ölge-
halt zu Col-0 zeigen. Damit konnte die Vererbbarkeit der Erhöhung
20 des Ölgehaltes als Effekt der Expression des gpd1-Genes demon-
striert werden.

Beispiel 8: Bestimmung von Glycerol-3-phosphatdehydrogenaseakti-
vität

25

Ein weiteres Ziel war neben der Erhöhung des Ölgehalts auch die
direkte Wirkung des Enzyms in den transgenen Pflanzen nachzuwei-
sen. Zur Bestimmung der Glycerol-3-phosphatdehydrogenase-Aktivi-
tät wurde je Pflanze zwei Arabidopsis Samenschoten geerntet und
30 nach Geigenberger und Stitt ((1993) Planta 189:329-339) extra-
hiert. Dazu wurden die Schoten in einem Mörser unter flüssigem
Stickstoff zermalen und mit 200 µL 50 mM HEPES pH 7,4, 5 mM MgCl₂,
1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 0,1% (w/w) Rinderserumalbumin, 2
mM Benzamidin, 2 mM Amino-n-capronsäure, 0,5 mM Phenylmethylsul-
35 fonyl, 0,1% Triton X-100 und 10% Glycerin (w/w) aufgenommen, 5
min zentrifugiert und der Überstand aliquotiert. Für die G3PDH
Aktivität wurde die Produktion von G3P (Glycerin-3-phosphat) aus
den Substraten DHAP (Dihydroxyacteonphosphat) und NADH gemessen.
Dazu wurde die Oxidation von NADH bei 340 nm verfolgt.

40

Der Reaktionsmix zur Bestimmung der Aktivität enthielt 50 mM HE-
PES pH 7,4, 4 mM DHAP, 0,2 mM NADH und 10 µl des Extraktionsmixes
in einem Endvolumen von 100 µL. Nach 30 min Inkubation bei Raum-
temperatur wurde die Reaktion durch Erhitzen (20 min, 95°C) ge-
45 stoppt. In der Kontrollreaktion wurde sofort durch Erhitzen inak-
tiviert.

41

Glycerol-3-phosphat "Cycling-Assay": 10 µl des Reaktionsgemisches wurden zu 45 µl einer Lösung enthaltend 200 mM Tricin, MgCl₂ 5 mM (pH 8,5) gegeben und erhitzt (20 min, 95°C), um verbleibendes DHAP zu zerstören. Der Überstand wurde in eine 96-Well Microplatte überführt, mit 45 µl eines Gemisches versetzt, welches 2 units G3Pox, 130 units Katalase, 0,4 unit G3PDH und 0,12 µmol NADH enthielt. Die Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt und die resultierende Absorbtion bei 340 nm in einer Anthos htII Microplatten-Lesegerät verfolgt. Reaktionsgeschwindigkeiten wurden anhand der Absorptionsabnahme in (mOD*min⁻¹) unter Verwendung der Biolise software berechnet (Gibon Y et al. (2002) Plant J 30(2):221-235).

Die transgenen Linien #11, #21, #41 und #67 zeigten dabei eine signifikant erhöhte Enzymaktivität im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Fig. 3). Die Pflanzen mit erhöhtem Ölgehalt korrelieren mit den Pflanzen mit erhöhter Enzymaktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Ölgehalt auf den erhöhten Umsatz von DHAP zu G3P, der Vorstufe zur Ölsynthese, zurückzuführen ist.

20**25****30****35****40****45**

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erhöhen des Gesamtölgehalt in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben, umfassend
 - a) transgene Expression einer Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe in besagtem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben und
 - b) Auswahl von pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - der Gesamtölgehalt in dem besagten pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe stammt ausgewählt aus den Gattungen Cryptococcus, Torulopsis, Pityrosporum, Brettanomyces, Candida, Kloeckera, Trigonopsis, Trichosporon, Rhodotorul, Sporobolomyces, Bullera, Saccharomyces, Debaryomyces, Lipomyces, Hansenula, Endomycopsis, Pichia und Hanseniaspora.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe stammt ausgewählt aus den Arten Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Zygosaccharomyces rouxii, Yarrowia lipolitica, Emericella nidulans, Aspergillus nidulans, Debaryomyces hansenii und Torulaspora hansenii.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase die Umsetzung von Dihydroxyacetophosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat bewirkt und eine Peptidsequenz aufweist, die mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
 - i) GSGNWGT(A/T)IAK
 - ii) CG(V/A)LSGAN(L/I/V)AXE(V/I)A
 - iii) (L/V)FXRPYFXV

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase die Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat bewirkt und eine Peptidsequenz aufweist, die mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
 - iv) GSGNWGTTIAKV(V/I)AEN
 - v) NT(K/R)HQNVKYLP
 - 10 vi) D(I/V)LVFN(I/V)PHQFL
 - vii) RA(I/V)SCLKGFE
 - viii) CGALSGANLA(P/T)EVA
 - ix) LFHRPYFHV
 - x) GLGEII(K/R)FG
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zusätzlich mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
 - 20 xi) H(E/Q)NVKYL
 - xii) (D/N)(I/V)(L/I)V(F/W)(V/N)(L/I/V)PHQF(V/L/I)
 - xiii) (A/G)(I/V)SC(L/I)KG
 - xiv) G(L/M)(L/G)E(M/I)(I/Q)(R/K/N)F(G/S/A)
- 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe beschrieben ist durch
 - 30 a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 38 oder 40, oder
 - b) ein funktionelle Äquivalent von a) mit einer Identität von mindestens 60% eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 2.
- 35 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze eine Ölpflanze ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Gesamtölgehalt im Samen einer Pflanze erhöht wird.
- 40 45 10. Transgene Expressionskassette umfassend unter Kontrolle eines in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben funktionellen Promotors eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-

phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe entsprechend den Definitionen in einem der Ansprüche 2 bis 7.

11. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 10, wobei die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase beschrieben ist durch
 - a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 oder
 - b) eine Sequenz, die sich entsprechend dem degenerierten genetischen Code von einer Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 ableitet, oder
 - c) eine Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % zu der Sequenz mit der SEQ ID NO: 1 aufweist.
12. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei der Promotor ein samenspezifischer Promotor ist.
13. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Transgener pflanzlicher Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben, enthaltend eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe entsprechend den Definitionen in einem der Ansprüche 2 bis 7 oder eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder einen Vektor nach Anspruch 13.
15. Transgener pflanzlicher Organismus nach Anspruch 14, wobei der pflanzliche Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe der Ölpflanzen bestehend aus *Borago officinalis*, *Brassica campestris*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Curthamus tinctorius*, *Cocos nucifera*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* Arten, *Elaeis guinensis*, *Ekeis oleiferu*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum*, *Helianthus annus*, *Linum usitatissimum*, *Oenethem biennis*, *Ozea europea*, *Oryza sativa*, *Ricinus communis*, *Sesamum indicum*, *Triticum* Arten, *Zea maize*, Walnuss und Mandel.
16. Verwendung eines transgenen pflanzlichen Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben nach einem der Ansprüche 14 oder 15 zur Herstellung von Ölen, Fetten, freien Fettsäuren oder Derivaten der vorgenannten.

1/3

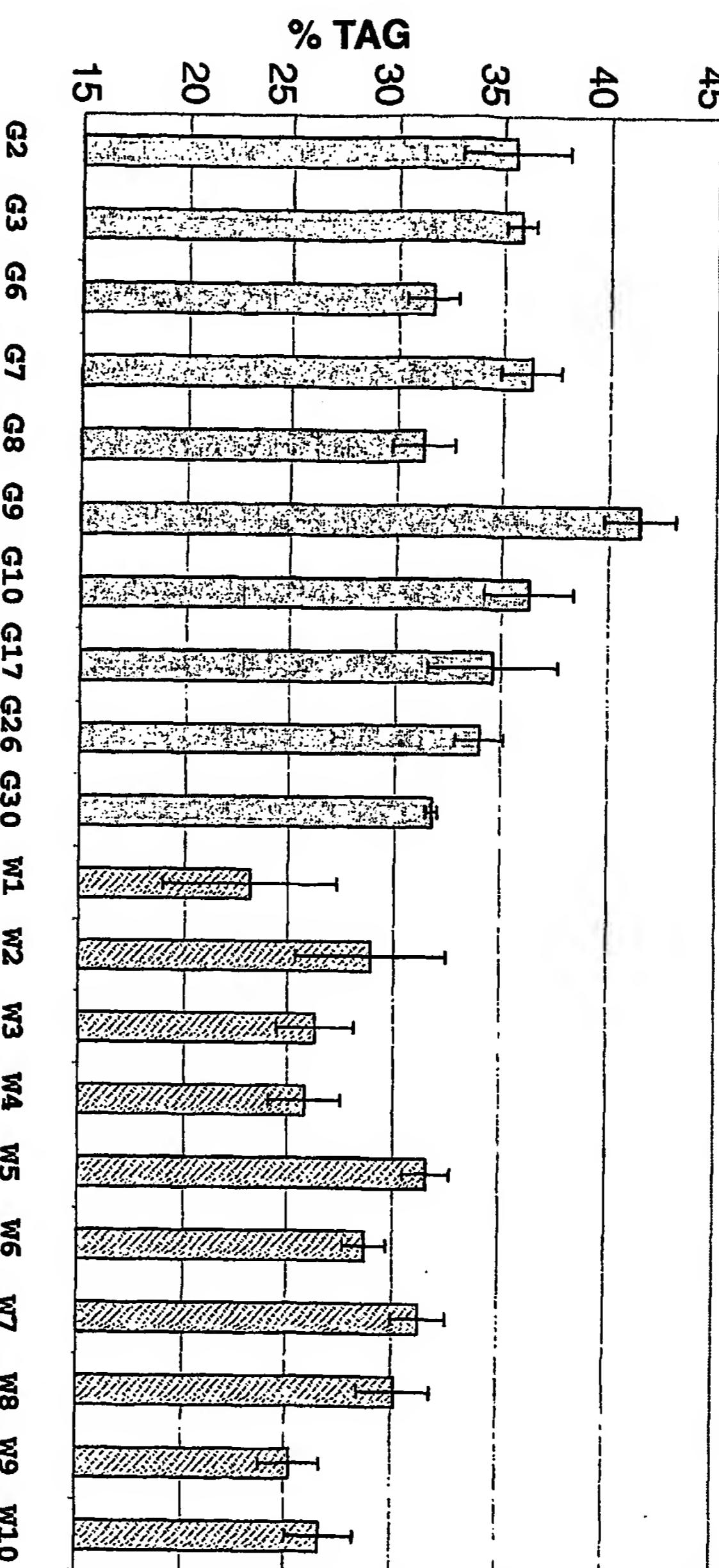


Fig. 1

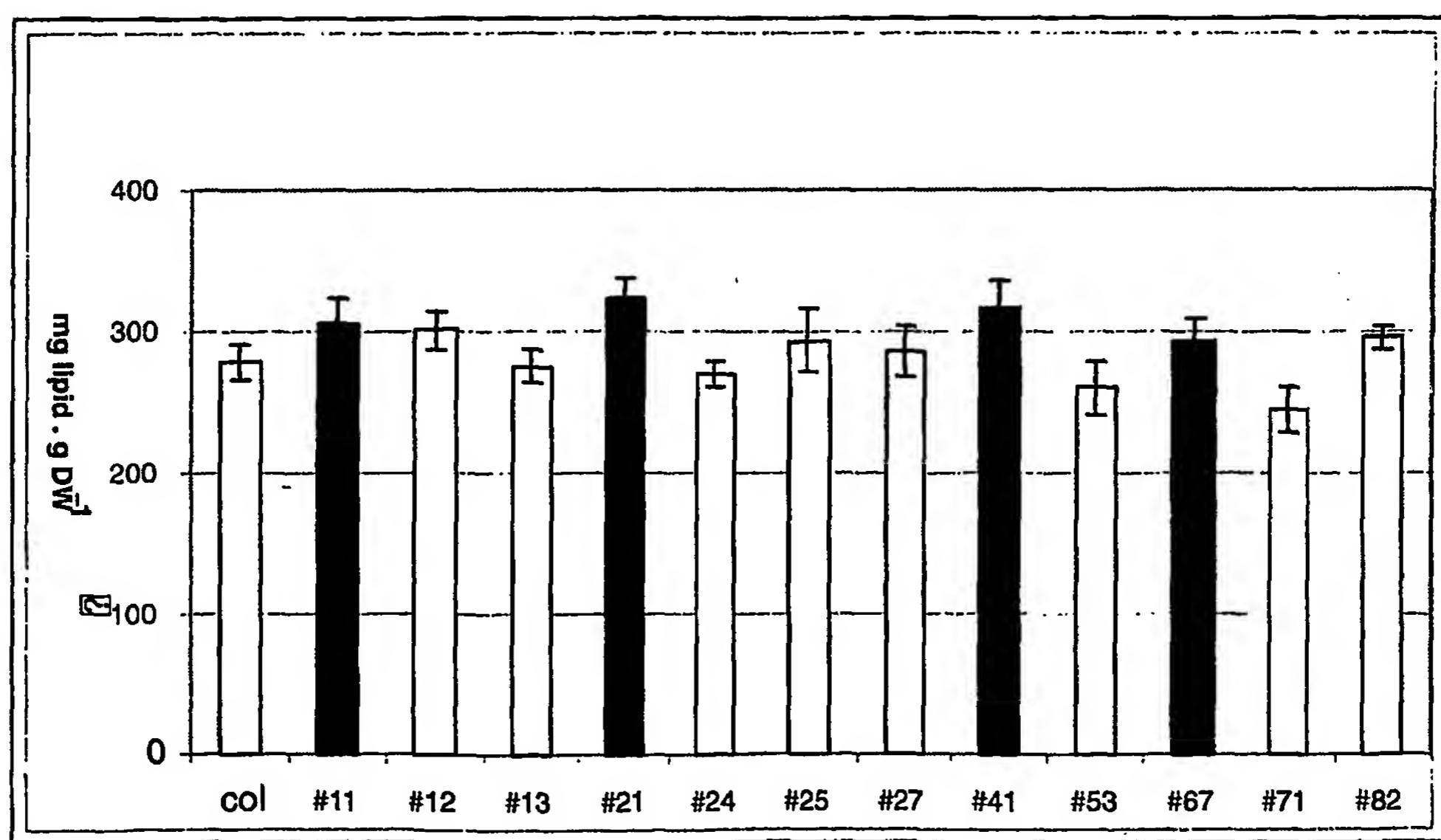


Fig. 2

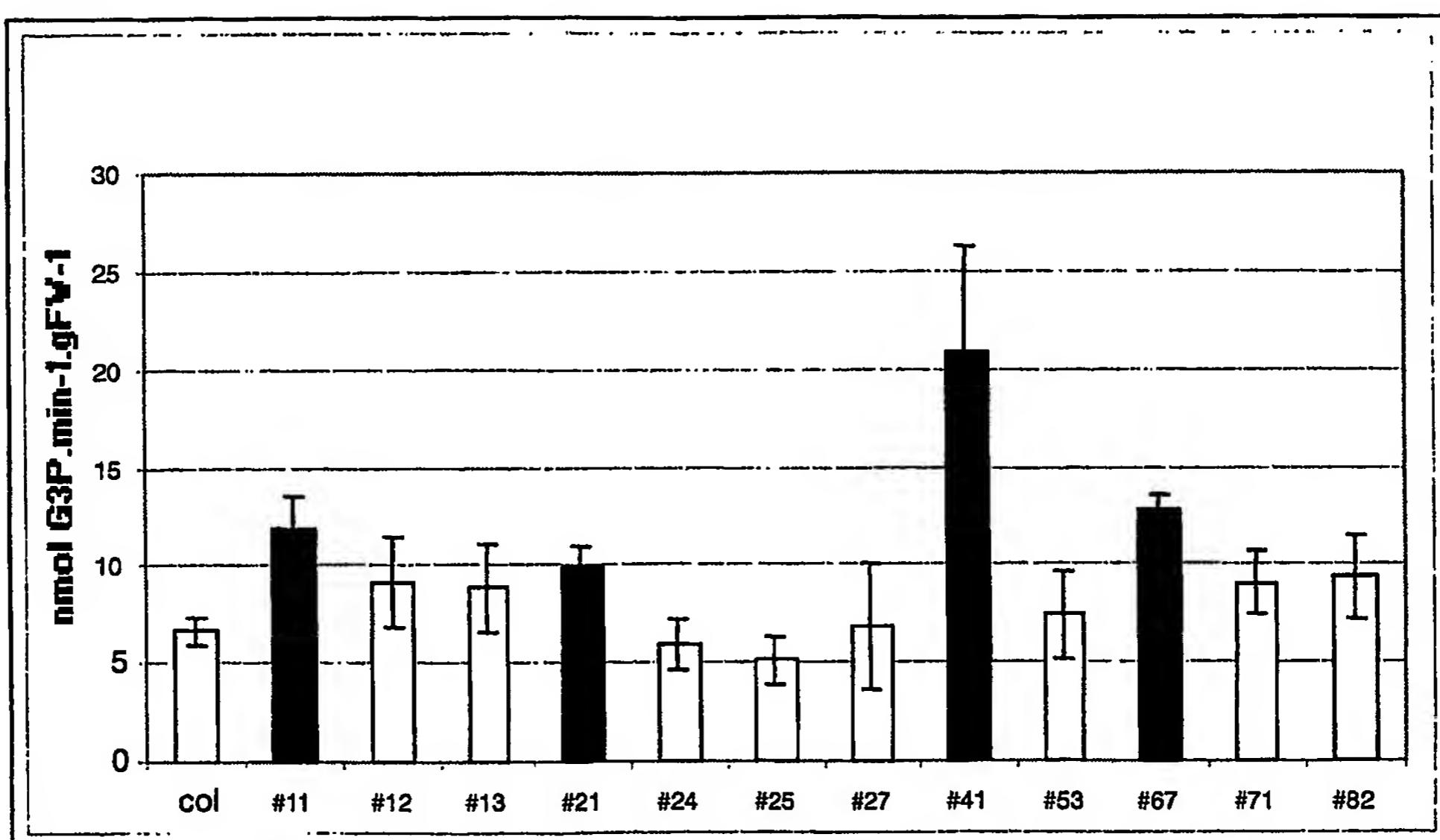


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH
<120> Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen
<130> NAE 2166/2002
<140>
<141>
<160> 40
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1176
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1173)
<223> coding for G3PDH
<400> 1
atg tct gct gct gat aga tta aac tta act tcc ggc cac ttg aat 48
Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
1 5 10 15
gct ggt aga aag aga agt tcc tct tct gtt tct ttg aag gct gcc gaa 96
Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
20 25 30
aag cct ttc aag gtt act gtg att gga tct ggt aac tgg ggt act act 144
Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
35 40 45
att gcc aag gtg gtt gcc gaa aat tgt aag gga tac cca gaa gtt ttc 192
Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
50 55 60
gct cca ata gta caa atg tgg gtg ttc gaa gaa gag atc aat ggt gaa 240
Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
65 70 75 80
aaa ttg act gaa atc ata aat act aga cat caa aac gtg aaa tac ttg 288
Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
85 90 95
cct ggc atc act cta ccc gac aat ttg gtt gct aat cca gac ttg att 336
Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
100 105 110
gat tca gtc aag gat gtc gac atc atc gtt ttc aac att cca cat caa 384
Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
115 120 125
ttt ttg ccc cgt atc tgt agc caa ttg aaa ggt cat gtt gat tca cac 432
Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
130 135 140
gtc aga gct atc tcc tgt cta aag ggt ttt gaa gtt ggt gct aaa ggt 480
Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
145 150 155 160
gtc caa ttg cta tcc tct tac atc act gag gaa cta ggt att caa tgt 528
Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
165 170 175

ggt gct cta tct ggt gct aac att gcc acc gaa gtc gct caa gaa cac		576	
Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His			
180	185	190	
tgg tct gaa aca aca gtt gct tac cac att cca aag gat ttc aga ggc		624	
Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly			
195	200	205	
gag ggc aag gac gtc gac cat aag gtt cta aag gcc ttg ttc cac aga		672	
Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg			
210	215	220	
cct tac ttc cac gtt agt gtc atc gaa gat gtt gct ggt atc tcc atc		720	
Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile			
225	230	235	240
tgt ggt gct ttg aag aac gtt gtt gcc tta ggt tgt ggt ttc gtc gaa		768	
Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu			
245	250	255	
ggt cta ggc tgg ggt aac aac gct tct gct gcc atc caa aga gtc ggt		816	
Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly			
260	265	270	
ttg ggt gag atc atc aga ttc ggt caa atg ttt ttc cca gaa tct aga		864	
Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg			
275	280	285	
gaa gaa aca tac tac caa gag tct gct ggt gtt gct gat ttg atc acc		912	
Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr			
290	295	300	
acc tgc gct ggt ggt aga aac gtc aag gtt gct agg cta atg gct act		960	
Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr			
305	310	315	320
tct ggt aag gac gcc tgg gaa tgt gaa aag gag ttg ttg aat ggc caa		1008	
Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln			
325	330	335	
tcc gct caa ggt tta att acc tgc aaa gaa gtt cac gaa tgg ttg gaa		1056	
Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu			
340	345	350	
aca tgt ggc tct gtc gaa gac ttc cca tta ttt gaa gcc gta tac caa		1104	
Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln			
355	360	365	
atc gtt tac aac aac tac cca atg aag aac ctg ccg gac atg att gaa		1152	
Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu			
370	375	380	
gaa tta gat cta cat gaa gat tag		1176	
Glu Leu Asp Leu His Glu Asp			
385	390		
<210> 2			
<211> 391			
<212> PRT			
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<400> 2			
Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn			
1	5	10	15
Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu			
20	25	30	

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45
 Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60
 Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110
 Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125
 Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140
 Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
 370 375 380
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390

<210> 3
<211> 1299
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1296)
<223> coding for G3PDH

<220>
<221> CDS
<222> (145)..(1296)
<223> coding for G3PDH (alternative Start codon)

<400> 3

atg	ctt	gct	gtc	aga	aga	tta	aca	aga	tac	aca	ttc	ctt	aag	cga	acg	48
Met		Leu	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Thr	Arg	Tyr	Thr	Phe	Leu	Lys	Arg	Thr
1		5					10						15			

cat	ccg	gtg	tta	tat	act	cgt	cgt	gca	tat	aaa	att	ttg	cct	tca	aga	96
His	Pro	Val	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Tyr	Lys	Ile	Leu	Pro	Ser	Arg	
			20					25				30				

tct	act	ttc	cta	aga	aga	tca	tta	caa	aca	caa	ctg	cac	tca	aag	144
Ser	Thr	Phe	Leu	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Thr	Gln	Leu	His	Ser	Lys
			35				40				45				

atg	act	gct	cat	act	aat	atc	aaa	cag	cac	aaa	cac	tgt	cat	gag	gac	192
Met	Thr	Ala	His	Thr	Asn	Ile	Lys	Gln	His	Lys	His	Cys	His	Glu	Asp	
			50			55			60							

cat	cct	atc	aga	aga	tcg	gac	tct	gcc	gtg	tca	att	gta	cat	ttg	aaa	240
His	Pro	Ile	Arg	Arg	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Ser	Ile	Val	His	Leu	Lys	
		65			70			75			80					

cgt	gcg	ccc	ttc	aag	gtt	aca	gtg	att	ggt	tct	ggt	aac	tgg	ggg	acc	288
Arg	Ala	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	
				85			90				95					

acc	atc	gcc	aaa	gtc	att	gcg	gaa	aac	aca	gaa	ttg	cat	tcc	cat	atc	336
Thr	Ile	Ala	Lys	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Thr	Glu	Leu	His	Ser	His	Ile	
				100			105			110						

ttc	gag	cca	gag	gtg	aga	atg	tgg	gtt	ttt	gat	gaa	aag	atc	ggc	gac	384
Phe	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Met	Trp	Val	Phe	Asp	Glu	Lys	Ile	Gly	Asp	
				115			120			125						

gaa	aat	ctg	acg	gat	atc	ata	aat	aca	aga	cac	cag	aac	gtt	aaa	tat	432
Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Asn	Thr	Arg	His	Gln	Asn	Val	Lys	Tyr	
				130			135			140						

cta	ccc	aat	att	gac	ctg	ccc	cat	aat	cta	gtg	gcc	gat	cct	gat	ctt	480
Leu	Pro	Asn	Ile	Asp	Leu	Pro	His	Asn	Leu	Val	Ala	Asp	Pro	Asp	Leu	
				145			150			155			160			

tta	cac	tcc	atc	aag	ggt	gct	gac	atc	ttt	gtt	ttc	aac	atc	cct	cat	528
Leu	His	Ser	Ile	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	His	
				165			170			175						

caa	ttt	tta	cca	aac	ata	gtc	aaa	caa	ttg	caa	ggc	cac	gtg	gcc	cct	576
Gln	Phe	Leu	Pro	Asn	Ile	Val	Lys	Gln	Leu	Gln	Gly	His	Val	Ala	Pro	
				180			185			190						

cat	gta	agg	gcc	atc	tcg	tgt	cta	aaa	ggg	ttc	gag	ttg	ggc	tcc	aag	624
His	Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Leu	Gly	Ser	Lys	
				195			200			205						

ggt gtg caa ttg cta tcc tcc tat gtt act gat gag tta gga atc caa	672
Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln	
210	215
220	
tgt ggc gca cta tct ggt gca aac ttg gca ccg gaa gtg gcc aag gag	720
Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu	
225	230
235	240
cat tgg tcc gaa acc acc gtg gct tac caa cta cca aag gat tat caa	768
His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln	
245	250
255	
ggt gat ggc aag gat gta gat cat aag att ttg aaa ttg ctg ttc cac	816
Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His	
260	265
270	
aga cct tac ttc cac gtc aat gtc atc gat gat gtt gct ggt ata tcc	864
Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser	
275	280
285	
att gcc ggt gcc ttg aag aac gtc gtg gca ctt gca tgt ggt ttc gta	912
Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val	
290	295
300	
gaa ggt atg gga tgg ggt aac aat gcc tcc gca gcc att caa agg ctg	960
Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu	
305	310
315	320
ggt tta ggt gaa att atc aag ttc ggt aga atg ttt ttc cca gaa tcc	1008
Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser	
325	330
335	
aaa gtc gag acc tac tat caa gaa tcc gct ggt gtt gca gat ctg atc	1056
Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile	
340	345
350	
acc acc tgc tca ggc ggt aga aac gtc aag gtt gcc aca tac atg gcc	1104
Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala	
355	360
365	
aag acc ggt aag tca gcc ttg gaa gca gaa aag gaa ttg ctt aac ggt	1152
Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly	
370	375
380	
caa tcc gcc caa ggg ata atc aca tgc aga gaa gtt cac gag tgg cta	1200
Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu	
385	390
395	400
caa aca tgt gag ttg acc caa gaa ttc cca att att cga ggc agt cta	1248
Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu	
405	410
415	
cca gat agt cta caa caa cgt ccg cat gga aga cct acc gga gat gat	1296
Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp	
420	425
430	
tga	1299
<210> 4	
<211> 432	
<212> PRT	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 4	
Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr	
1	5
	10
	15

His	Pro	Val	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Tyr	Lys	Ile	Leu	Pro	Ser	Arg
					20					25					30
Ser	Thr	Phe	Leu	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Thr	Gln	Leu	His	Ser	Lys
					35					40					45
Met	Thr	Ala	His	Thr	Asn	Ile	Lys	Gln	His	Lys	His	Cys	His	Glu	Asp
					50					55					60
His	Pro	Ile	Arg	Arg	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Ser	Ile	Val	His	Leu	Lys
					65					70					80
Arg	Ala	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr
					85					90					95
Thr	Ile	Ala	Lys	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Thr	Glu	Leu	His	Ser	His	Ile
					100					105					110
Phe	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Met	Trp	Val	Phe	Asp	Glu	Lys	Ile	Gly	Asp
					115					120					125
Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Asn	Thr	Arg	His	Gln	Asn	Val	Lys	Tyr
					130					135					140
Leu	Pro	Asn	Ile	Asp	Leu	Pro	His	Asn	Leu	Val	Ala	Asp	Pro	Asp	Leu
					145					150					160
Leu	His	Ser	Ile	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	His
					165					170					175
Gln	Phe	Leu	Pro	Asn	Ile	Val	Lys	Gln	Leu	Gln	Gly	His	Val	Ala	Pro
					180					185					190
His	Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Leu	Gly	Ser	Lys
					195					200					205
Gly	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Val	Thr	Asp	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln
					210					215					220
Cys	Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Lys	Glu
					225					230					240
His	Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Tyr	Gln
					245					250					255
Gly	Asp	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Ile	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	His
					260					265					270
Arg	Pro	Tyr	Phe	His	Val	Asn	Val	Ile	Asp	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser
					275					280					285
Ile	Ala	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Gly	Phe	Val
					290					295					300
Glu	Gly	Met	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Leu
					305					310					320
Gly	Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Lys	Phe	Gly	Arg	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser
					325					330					335
Lys	Val	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile
					340					345					350
Thr	Thr	Cys	Ser	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Thr	Tyr	Met	Ala
					355					360					365
Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly
					370					375					380
Gln	Ser	Ala	Gln	Gly	Ile	Ile	Thr	Cys	Arg	Glu	Val	His	Glu	Trp	Leu
					385					390					400
Gln	Thr	Cys	Glu	Leu	Thr	Gln	Glu	Phe	Pro	Ile	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu
					405					410					415
Pro	Asp	Ser	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	His	Gly	Arg	Pro	Thr	Gly	Asp	Asp
					420					425					430

<210> 5

<211> 384

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp
 1 5 10 15
 His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys
 20 25 30
 Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr
 35 40 45
 Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile
 50 55 60
 Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
 85 90 95
 Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
 100 105 110
 Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
 115 120 125
 Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
 130 135 140
 His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln
 165 170 175
 Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu
 180 185 190
 His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln
 195 200 205
 Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His
 210 215 220
 Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val
 245 250 255
 Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu
 260 265 270
 Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser
 275 280 285
 Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile
 290 295 300
 Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly
 325 330 335
 Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu
 340 345 350
 Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu
 355 360 365
 Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp
 370 375 380

<210> 6

<211> 1122

<212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<223> coding for G3PDH

<400> 6

atg	act	gtg	gct	gct	ttg	aac	aaa	ctc	agc	gct	ctc	tcc	gga	agt	att	48
Met	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser	Ile	
1			5					10					15			
caa	aaa	tct	ttt	tca	cct	aaa	ctt	att	tct	gtt	ggt	atc	atc	gga	tca	96
Gln	Lys	Ser	Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Gly	Ile	Ile	Gly	Ser	
			20					25					30			
gga	aat	tgg	gga	acc	gct	att	gct	aaa	ata	tgt	ggt	gaa	aat	gcc	aag	144
Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Lys	Ile	Cys	Gly	Glu	Asn	Ala	Lys	
			35					40				45				
gct	cat	cct	gat	att	ttc	cat	cct	caa	gta	cac	atg	tgg	atg	tat	gaa	192
Ala	His	Pro	Asp	Ile	Phe	His	Pro	Gln	Val	His	Met	Trp	Met	Tyr	Glu	
			50					55				60				
gag	aag	att	caa	cat	gag	gga	aaa	gag	tgc	aat	ctc	acg	gaa	gtt	ttt	240
Glu	Lys	Ile	Gln	His	Glu	Gly	Lys	Glu	Cys	Asn	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	
			65					70			75		80			
aac	act	act	cat	gaa	aac	gtt	aaa	tat	ctc	aaa	ggt	atc	aaa	tgc	cct	288
Asn	Thr	Thr	His	Glu	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Lys	Cys	Pro	
			85					90			95					
tct	aac	gtc	ttc	gca	aac	ccg	gac	att	cgt	gat	gta	ggt	tca	cgt	agc	336
Ser	Asn	Val	Phe	Ala	Asn	Pro	Asp	Ile	Arg	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	
			100					105			110					
gac	att	ctg	gta	tgg	gtt	ctc	cct	cac	cag	ttc	gtt	gtg	cgt	att	tgc	384
Asp	Ile	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Pro	His	Gln	Phe	Val	Val	Arg	Ile	Cys	
			115					120			125					
aat	caa	ttg	aag	gga	tgc	cta	aag	aag	gat	gct	gtt	gca	att	tca	tgc	432
Asn	Gln	Leu	Lys	Gly	Cys	Leu	Lys	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Ile	Ser	Cys	
			130					135			140					
atc	aaa	ggt	gta	tct	gtc	acc	aag	gac	cgt	gtt	cgc	ctc	ttt	tct	gat	480
Ile	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Asp	Arg	Val	Arg	Leu	Phe	Ser	Asp	
			145					150			155		160			
att	atc	gaa	gaa	aac	acg	gga	atg	tat	tgt	ggc	gtt	ctc	tct	ggc	gcc	528
Ile	Ile	Glu	Glu	Asn	Thr	Gly	Met	Tyr	Cys	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ala	
			165					170			175					
aac	att	gcc	agc	gaa	gtt	gct	caa	gag	aag	ttt	tgc	gaa	act	act	atc	576
Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	Lys	Phe	Cys	Glu	Thr	Thr	Ile	
			180					185			190					
gga	tat	ttg	cct	aat	agt	tct	gtt	aat	ccc	cgc	tat	act	cct	aag	act	624
Gly	Tyr	Leu	Pro	Asn	Ser	Ser	Val	Asn	Pro	Arg	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	
			195					200			205					
atc	caa	gct	ttg	ttt	aac	cgt	ccc	tac	ttc	cgt	gtc	aac	att	gtt	gag	672
Ile	Gln	Ala	Leu	Phe	Asn	Arg	Pro	Tyr	Phe	Arg	Val	Asn	Ile	Val	Glu	
			210					215			220					
gat	gtt	cct	ggt	gtt	gct	ttg	ggc	ggt	gca	ctc	aag	aat	atc	gtc	gct	720
Asp	Val	Pro	Gly	Val	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	
			225					230			235		240			
gtc	gct	gcc	ggt	att	att	gat	gga	ctt	gaa	ttg	gga	gat	aat	acc	aaa	768
Val	Ala	Ala	Gly	Ile	Ile	Asp	Gly	Leu	Glu	Leu	Gly	Asp	Asn	Thr	Lys	
			245					250			255					

tct gct gtt atg cgc att ggc ctt ctg gaa atg cag aaa ttc ggc agg		816		
Ser Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Gly Arg				
260	265	270		
atg ttt ttc gat tgt aag cct ctt act atg agc gag gaa tct tgt ggc		864		
Met Phe Phe Asp Cys Lys Pro Leu Thr Met Ser Glu Glu Ser Cys Gly				
275	280	285		
ata gcc gat tta att aca act tgc tta ggc ggc cgt aac cac aaa tgc		912		
Ile Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Leu Gly Gly Arg Asn His Lys Cys				
290	295	300		
gct gtg gca ttt gtc aag aca gga aag ccc atg cat gtt gtt gaa caa		960		
Ala Val Ala Phe Val Lys Thr Gly Lys Pro Met His Val Val Glu Gln				
305	310	315	320	
gaa ctt ctt gat ggt cag aag ttg caa ggt gca gct acc gcg aag gag		1008		
Glu Leu Leu Asp Gly Gln Lys Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ala Lys Glu				
325	330	335		
gtt tat gag ttc ctt gat aac cag aat aag gta agc gaa ttc cca ttg		1056		
Val Tyr Glu Phe Leu Asp Asn Gln Asn Lys Val Ser Glu Phe Pro Leu				
340	345	350		
ttt aca gct gtt tat cgc att gtt tat gag gga ctt cca cct aat aag		1104		
Phe Thr Ala Val Tyr Arg Ile Val Tyr Glu Gly Leu Pro Pro Asn Lys				
355	360	365		
ctt ctg gag gct att taa		1122		
Leu Leu Glu Ala Ile				
370				
<210> 7				
<211> 373				
<212> PRT				
<213> Schizosaccharomyces pombe				
<400> 7				
Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Lys Leu Ser Ala Leu Ser Gly Ser Ile				
1	5	10	15	
Gln Lys Ser Phe Ser Pro Lys Leu Ile Ser Val Gly Ile Ile Gly Ser				
20		25	30	
Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Lys				
35		40	45	
Ala His Pro Asp Ile Phe His Pro Gln Val His Met Trp Met Tyr Glu				
50		55	60	
Glu Lys Ile Gln His Glu Gly Lys Glu Cys Asn Leu Thr Glu Val Phe				
65		70	75	80
Asn Thr Thr His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Cys Pro				
85		90	95	
Ser Asn Val Phe Ala Asn Pro Asp Ile Arg Asp Val Gly Ser Arg Ser				
100		105	110	
Asp Ile Leu Val Trp Val Leu Pro His Gln Phe Val Val Arg Ile Cys				
115		120	125	
Asn Gln Leu Lys Gly Cys Leu Lys Asp Ala Val Ala Ile Ser Cys				
130		135	140	
Ile Lys Gly Val Ser Val Thr Lys Asp Arg Val Arg Leu Phe Ser Asp				
145		150	155	160

Ile Ile Glu Glu Asn Thr Gly Met Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala
 165 170 175
 Asn Ile Ala Ser Glu Val Ala Gln Glu Lys Phe Cys Glu Thr Thr Ile
 180 185 190
 Gly Tyr Leu Pro Asn Ser Ser Val Asn Pro Arg Tyr Thr Pro Lys Thr
 195 200 205
 Ile Gln Ala Leu Phe Asn Arg Pro Tyr Phe Arg Val Asn Ile Val Glu
 210 215 220
 Asp Val Pro Gly Val Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala
 225 230 235 240
 Val Ala Ala Gly Ile Ile Asp Gly Leu Glu Leu Gly Asp Asn Thr Lys
 245 250 255
 Ser Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Gly Arg
 260 265 270
 Met Phe Phe Asp Cys Lys Pro Leu Thr Met Ser Glu Glu Ser Cys Gly
 275 280 285
 Ile Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Leu Gly Gly Arg Asn His Lys Cys
 290 295 300
 Ala Val Ala Phe Val Lys Thr Gly Lys Pro Met His Val Val Glu Gln
 305 310 315 320
 Glu Leu Leu Asp Gly Gln Lys Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ala Lys Glu
 325 330 335
 Val Tyr Glu Phe Leu Asp Asn Gln Asn Lys Val Ser Glu Phe Pro Leu
 340 345 350
 Phe Thr Ala Val Tyr Arg Ile Val Tyr Glu Gly Leu Pro Pro Asn Lys
 355 360 365
 Leu Leu Glu Ala Ile
 370

<210> 8
<211> 1155
<212> DNA
<213> Schizosaccharomyces pombe
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1152)
<223> coding for G3PDH
<400> 8
atg tct gga tat ggt caa caa ggt gtt tct gct gcc aac atc gac agc 48
Met Ser Gly Tyr Gly Gln Gln Gly Val Ser Ala Ala Asn Ile Asp Ser
 1 5 10 15
atc cgc ccc aag aaa cgt ttg tca att ggt gta gtt ggc tcc ggt aac 96
Ile Arg Pro Lys Lys Arg Leu Ser Ile Gly Val Val Gly Ser Gly Asn
 20 25 30
tgg ggt act gcc att gcc aag att tgc ggt gaa aat gcc cgt gcc cac 144
Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Arg Ala His
 35 40 45
ggt cac cat ttc aga ggt aag ggg cgc atg tgg gtc ttt gag gag gag 192
Gly His His Phe Arg Gly Lys Gly Arg Met Trp Val Phe Glu Glu Glu
 50 55 60

att gag tac aag ggt gag aag aag aag ctc acc gaa gta ttc aac gaa Ile Glu Tyr Lys Gly Glu Lys Arg Lys Leu Thr Glu Val Phe Asn Glu 65 70 75 80	240
gct cac gag aat gtc aaa tac tta ccc ggc atc gaa tgc cct ccc aac Ala His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Glu Cys Pro Pro Asn 85 90 95	288
gtt att gcc gtc ccc gat gtt cgt gag gtc gct aga cgt gcc gac atc Val Ile Ala Val Pro Asp Val Arg Glu Val Ala Arg Arg Ala Asp Ile 100 105 110	336
ctt gtc ttt gtc gtt cct cat caa ttt att gaa cgc gtt tgg cac caa Leu Val Phe Val Val Pro His Gln Phe Ile Glu Arg Val Trp His Gln 115 120 125	384
atg gtc ggt ctc att cgc cct ggt gcc gtt ggt att tcc tgt atc aag Met Val Gly Leu Ile Arg Pro Gly Ala Val Gly Ile Ser Cys Ile Lys 130 135 140	432
ggg gtt gct gtc agc aag gaa ggc tcg ctt tac tct gag gtt atc agc Gly Val Ala Val Ser Lys Glu Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Val Ile Ser 145 150 155 160	480
gag aaa ctc ggt att tac tgt ggt gtt ctt tct ggt gct aac gtt gca Glu Lys Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Val Ala 165 170 175	528
aac gaa gtt gcc cgt gag caa ttc tgt gag act act att ggt ttc aac Asn Glu Val Ala Arg Glu Gln Phe Cys Glu Thr Thr Ile Gly Phe Asn 180 185 190	576
cct cct aat gaa gtt gat atc cct cgc gag caa atc gcc gcc gtc tct Pro Pro Asn Glu Val Asp Ile Pro Arg Glu Gln Ile Ala Ala Val Ser 195 200 205	624
gat cgc cct tac ttc tca gtt gtc tcc gtt gac gac gtt gcc ggt gtc Asp Arg Pro Tyr Phe Ser Val Val Ser Val Asp Asp Val Ala Gly Val 210 215 220	672
gcc ttg ggt ggt gct ttg aag aac gta gtt gcc atg gcc gtt ggt ttc Ala Leu Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Met Ala Val Gly Phe 225 230 235 240	720
gct gat ggt ttg gaa tgg ggc ggt aat acc aag gcc gct att atg cgt Ala Asp Gly Leu Glu Trp Gly Gly Asn Thr Lys Ala Ala Ile Met Arg 245 250 255	768
cgt ggt ttg ttg gag atg caa aag ttt gct act acc ttc ttc gac tct Arg Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Ala Thr Phe Phe Asp Ser 260 265 270	816
gat cct cgt acc atg gag caa tct tgc ggt atc gct gac ttg gtc Asp Pro Arg Thr Met Val Glu Gln Ser Cys Gly Ile Ala Asp Leu Val 275 280 285	864
act tct tgt ttg ggt ggc cgt aac aat cgt tgt gct gaa gca ttt gtc Thr Ser Cys Leu Gly Gly Arg Asn Asn Arg Cys Ala Glu Ala Phe Val 290 295 300	912
aag act ggt aaa tct tta gag acg ctt gaa aaa gag ctc tta ggt ggt Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Leu Gly Gly 305 310 315 320	960
caa ctt ctt caa gga gct gcc act tcc aag gat gtt cat gaa ttc ctt Gln Leu Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ser Lys Asp Val His Glu Phe Leu 325 330 335	1008

12

ctc acc aag gat atg gtc aag gat ttc ccc ttg ttc act gcc gtt tat		1056	
Leu Thr Lys Asp Met Val Lys Asp Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr			
340	345	350	
aac att tcc tat gaa gac atg gat ccc aag gat ttg atc atc gtc ctt		1104	
Asn Ile Ser Tyr Glu Asp Met Asp Pro Lys Asp Leu Ile Ile Val Leu			
355	360	365	
caa ccc ctt aag gag gac tct gag aac gag ggc ggt act gaa acc gag		1152	
Gln Pro Leu Lys Glu Asp Ser Glu Asn Glu Gly Gly Thr Glu Thr Glu			
370	375	380	
taa		1155	
<210> 9			
<211> 384			
<212> PRT			
<213> Schizosaccharomyces pombe			
<400> 9			
Met Ser Gly Tyr Gly Gln Gln Gly Val Ser Ala Ala Asn Ile Asp Ser			
1	5	10	15
Ile Arg Pro Lys Lys Arg Leu Ser Ile Gly Val Val Gly Ser Gly Asn			
20	25	30	
Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Arg Ala His			
35	40	45	
Gly His His Phe Arg Gly Lys Gly Arg Met Trp Val Phe Glu Glu Glu			
50	55	60	
Ile Glu Tyr Lys Gly Glu Lys Arg Lys Leu Thr Glu Val Phe Asn Glu			
65	70	75	80
Ala His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Glu Cys Pro Pro Asn			
85	90	95	
Val Ile Ala Val Pro Asp Val Arg Glu Val Ala Arg Arg Ala Asp Ile			
100	105	110	
Leu Val Phe Val Val Pro His Gln Phe Ile Glu Arg Val Trp His Gln			
115	120	125	
Met Val Gly Leu Ile Arg Pro Gly Ala Val Gly Ile Ser Cys Ile Lys			
130	135	140	
Gly Val Ala Val Ser Lys Glu Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Val Ile Ser			
145	150	155	160
Glu Lys Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Val Ala			
165	170	175	
Asn Glu Val Ala Arg Glu Gln Phe Cys Glu Thr Thr Ile Gly Phe Asn			
180	185	190	
Pro Pro Asn Glu Val Asp Ile Pro Arg Glu Gln Ile Ala Ala Val Ser			
195	200	205	
Asp Arg Pro Tyr Phe Ser Val Val Ser Val Asp Asp Val Ala Gly Val			
210	215	220	
Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Met Ala Val Gly Phe			
225	230	235	240
Ala Asp Gly Leu Glu Trp Gly Gly Asn Thr Lys Ala Ala Ile Met Arg			
245	250	255	
Arg Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Ala Thr Thr Phe Phe Asp Ser			
260	265	270	

Asp Pro Arg Thr Met Val Glu Gln Ser Cys Gly Ile Ala Asp Leu Val
 275 280 285
 Thr Ser Cys Leu Gly Gly Arg Asn Asn Arg Cys Ala Glu Ala Phe Val
 290 295 300
 Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Leu Gly Gly
 305 310 315 320
 Gln Leu Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ser Lys Asp Val His Glu Phe Leu
 325 330 335
 Leu Thr Lys Asp Met Val Lys Asp Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr
 340 345 350
 Asn Ile Ser Tyr Glu Asp Met Asp Pro Lys Asp Leu Ile Ile Val Leu
 355 360 365
 Gln Pro Leu Lys Glu Asp Ser Glu Asn Glu Gly Gly Thr Glu Thr Glu
 370 375 380

<210> 10
 <211> 1197
 <212> DNA
 <213> Yarrowia lipolytica
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1194)
 <223> coding for G3PDH
 <220>
 <221> CDS
 <222> (40)..(1194)
 <400> 10

atg	agc	gct	cta	ctt	aga	tgc	tcc	ctg	cgt	ttt	aaa	cac	atg	tcc	gcc		48
Met	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	His	Met	Ser	Ala		
1			5					10					15				
gtc	aac	cgt	ctc	aca	caa	cag	ctt	cga	ctg	acc	gcc	tcc	gcg	cct		96	
Val	Asn	Arg	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Arg	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Ala	Pro		
			20				25					30					
ctc	agc	gca	gcc	aac	acc	ggc	aag	gct	cct	ttc	aag	gtc	gcc	gtt		144	
Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Thr	Ala	Gly	Lys	Ala	Pro	Phe	Lys	Val	Ala	Val		
			35				40					45					
gtt	ggt	tct	ggt	aac	tgg	gga	acc	acc	gtc	gcc	aag	att	gtc	gcc	gag	192	
Val	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Lys	Ile	Val	Ala	Glu		
			50				55				60						
aac	tgc	act	gct	cac	ccc	gag	ctc	ttt	gag	ccc	gag	gtt	cga	gtc	tgg	240	
Asn	Cys	Thr	Ala	His	Pro	Glu	Leu	Phe	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Val	Trp		
			65				70			75		80					
gtt	cga	gaa	gag	aag	gtc	aac	ggc	aag	aac	ctg	acc	gac	att	ttc	aac	288	
Val	Arg	Glu	Glu	Lys	Val	Asn	Gly	Lys	Asn	Leu	Thr	Asp	Ile	Phe	Asn		
			85				90					95					
gct	gag	cac	gag	aac	gtg	cga	tac	ctc	cct	aaa	atc	aaa	ctt	cct	cac	336	
Ala	Glu	His	Glu	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Lys	Leu	Pro	His		
			100					105				110					
aac	ctg	atc	gcc	gag	ccg	gat	ctg	ctc	aag	gcc	gtc	gag	ggt	gcc	aac	384	
Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Glu	Gly	Ala	Asn		
			115				120				125						

atc atc gtc ttc aac ctg ccc cat cag ttc ctg gct ggt gtc tgc aag		432
Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly Val Cys Lys		
130	135	140
cag ctc aag ggc cac gtc aac ccc aag gct aga gcc atc tcc tgc ctc		480
Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu		
145	150	155
aag ggt cta gat gtc acc ccc cag ggt gtt tac ctg ctc tcc gac gtt		528
Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu Ser Asp Val		
165	170	175
atc gag aac gag acc ggt ctc cac tgc ggt gtt ctg tcc ggg gct aac		576
Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn		
180	185	190
ctc gcc acc gag atc gct ctg gag aag tac tcc gag act acc gtt gct		624
Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr Thr Val Ala		
195	200	205
tac aac cga ccc aag gac ttc ttt ggc gag ggt gat gtg acc aac gat		672
Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val Thr Asn Asp		
210	215	220
gtg ctc aag gct ctg ttc cac cga ccc tac ttc cat gtg cga tgc gtt		720
Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Cys Val		
225	230	235
240		
cag gac gtc gcc ggt gtc tcc atc gga ggt gcc ctt aag aac gtt gtt		768
Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val		
245	250	255
gcc ctt tgc gcc ggt ttc gtc gag ggc aag aac tgg gga gac aac gcc		816
Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly Asp Asn Ala		
260	265	270
aag gcc gca att atg cga cga ggc atg ctt gag atg atc aac ttc tcc		864
Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile Asn Phe Ser		
275	280	285
aag cga ttc ttc ccc gaa act gat att aac act ctt aca gtc gag tct		912
Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr Val Glu Ser		
290	295	300
305		
gcc ggt gtg gcc gat ctc atc acc tcg tgc gct gga ggc cga aac ttc		960
Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly Arg Asn Phe		
310	315	320
aag gtc ggc cga gca ttc gga aag gag agc ggc tcc ggc aag acc atc		1008
Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Ile		
325	330	335
cag gac gtg gag aag gag ctt ctc aac ggc cag tcc gcc cag ggc gtc		1056
Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Val		
340	345	350
355		
atc aca tgt aac gag gtc cac gag ctg ctc aag aac aag aac atg cag		1104
Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys Asn Met Gln		
360	365	
aag gac ttc cct ctg ttc gag tcc acc tgg ggc att atc cac ggt gag		1152
Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile His Gly Glu		
370	375	380
ctc aag att gat gat ctc ccc gag att ctt tac cac gcc aac tag		1197
Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala Asn		
385	390	395

<210> 11
<211> 398
<212> PRT
<213> Yarrowia lipolytica

<400> 11
Met Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ser Leu Arg Phe Lys His Met Ser Ala
1 5 10 15
Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ser Ala Pro
20 25 30
Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys Val Ala Val
35 40 45
Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile Val Ala Glu
50 55 60
Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val Arg Val Trp
65 70 75 80
Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp Ile Phe Asn
85 90 95
Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Leu Pro His
100 105 110
Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu Gly Ala Asn
115 120 125
Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly Val Cys Lys
130 135 140
Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu
145 150 155 160
Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu Ser Asp Val
165 170 175
Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn
180 185 190
Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr Thr Val Ala
195 200 205
Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val Thr Asn Asp
210 215 220
Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Cys Val
225 230 235 240
Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val
245 250 255
Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly Asp Asn Ala
260 265 270
Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile Asn Phe Ser
275 280 285
Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr Val Glu Ser
290 295 300
Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly Arg Asn Phe
305 310 315 320
Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Ile
325 330 335
Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Val
340 345 350
Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys Asn Met Gln
355 360 365
Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile His Gly Glu
370 375 380
Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala Asn
385 390 395

<210> 12

<211> 385

<212> PRT

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 12

Met Ser Ala Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala
1 5 10 15
Ser Ala Pro Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys
20 25 30
Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile
35 40 45
Val Ala Glu Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val
50 55 60
Arg Val Trp Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Ile Phe Asn Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys
85 90 95
Leu Pro His Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu
100 105 110
Gly Ala Asn Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly
115 120 125
Val Cys Lys Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile
130 135 140
Ser Cys Leu Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu
145 150 155 160
Ser Asp Val Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser
165 170 175
Gly Ala Asn Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr
180 185 190
Thr Val Ala Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val
195 200 205
Thr Asn Asp Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val
210 215 220
Arg Cys Val Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys
225 230 235 240
Asn Val Val Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly
245 250 255
Asp Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile
260 265 270
Asn Phe Ser Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr
275 280 285
Val Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly
290 295 300
Arg Asn Phe Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly
305 310 315 320
Lys Thr Ile Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala
325 330 335
Gln Gly Val Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys
340 345 350
Asn Met Gln Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile
355 360 365
His Gly Glu Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala
370 375 380
Asn
385

<210> 13
 <211> 1206
 <212> DNA
 <213> Zygosaccharomyces rouxii
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1203)
 <223> coding for G3PDH
 <400> 13

atg	gcc	gct	act	gac	aga	tta	aac	caa	acc	tct	gat	atc	cta	tcg	caa	48
Met	Ala	Ala	Thr	Asp	Arg	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	Ser	Gln	
1		5							10					15		
tct	atg	aag	aag	acc	gac	tca	tca	atg	tca	gtc	gtt	acc	gct	gag	aat	96
Ser	Met	Lys	Lys	Thr	Asp	Ser	Ser	Met	Ser	Val	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	
20								25					30			
cca	tac	aaa	gtt	tcc	gtc	gtc	ggc	tct	ggt	aac	tgg	ggt	acc	acc	atc	144
Pro	Tyr	Lys	Val	Ser	Val	Val	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Thr	Ile	
35								40					45			
gcc	aag	gtc	gtt	gcc	gaa	aac	acc	aag	gaa	cca	gaa	ttg	ttc	caa	192	
Ala	Lys	Val	Val	Ala	Glu	Asn	Thr	Lys	Glu	Lys	Pro	Glu	Leu	Phe	Gln	
50				55					60							
gaa	cgt	gtg	gac	atg	tgg	gtg	ttt	gaa	gaa	cag	atc	gac	ggt	act	cca	240
Glu	Arg	Val	Asp	Met	Trp	Val	Phe	Glu	Glu	Gln	Ile	Asp	Gly	Thr	Pro	
65				70				75					80			
ttg	gcc	caa	atc	atc	aac	acc	aag	cac	cag	aac	gtg	aaa	tac	ttg	cca	288
Leu	Ala	Gln	Ile	Ile	Asn	Thr	Lys	His	Gln	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	Pro	
85					90				95							
aac	atc	gac	ctt	ccg	gac	aat	ttg	gtc	gct	aac	cca	gac	ttg	att	gcc	336
Asn	Ile	Asp	Leu	Pro	Asp	Asn	Leu	Val	Ala	Asn	Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	
100						105			110							
acc	acg	aag	gac	gcc	gat	gtg	att	gtt	ttc	aac	gtt	ccc	cat	caa	ttt	384
Thr	Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Val	Ile	Val	Phe	Asn	Val	Pro	His	Gln	Phe	
115						120				125						
ttg	ggc	cgt	atc	gtt	gct	caa	atg	aag	ggt	caa	atc	aaa	cca	act	gca	432
Leu	Gly	Arg	Ile	Val	Ala	Gln	Met	Lys	Gly	Gln	Ile	Lys	Pro	Thr	Ala	
130				135					140							
cgt	gcg	gtc	tcc	tgt	cta	aag	ggt	ttc	gaa	gtt	ggt	cca	aag	ggt	gtg	480
Arg	Ala	Val	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Pro	Lys	Gly	Val	
145					150				155				160			
cag	ctt	cta	tct	gac	tac	gtc	act	caa	gaa	ttg	ggt	atc	gaa	tgt	ggt	528
Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Tyr	Val	Thr	Gln	Glu	Leu	Gly	Ile	Glu	Cys	Gly	
165						170			175							
gct	cta	tct	ggt	gct	aac	ttg	gcc	cca	gaa	gtc	gcc	aag	gaa	cac	tgg	576
Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Lys	Glu	His	Trp	
180						185			190							
tcc	gag	acc	acc	gtc	gct	tac	cac	atc	cca	gac	gac	ttc	aag	ggt	gac	624
Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Asp	
195					200				205							
ggt	aag	gac	atc	gac	cac	cgt	gtc	ttg	aag	cag	ttg	ttc	cac	aga	cca	672
Gly	Lys	Asp	Ile	Asp	His	Arg	Val	Leu	Lys	Gln	Leu	Phe	His	Arg	Pro	
210					215				220							

tac ttc cac gtg aat gtg att gac gat gtt gct ggt atc tcc atc gca	720
Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala	
225 230 235 240	
ggt gca ttg aag aac gtg gtc gcc ttg ggt tgc ggt ttc gtt acc ggt	768
Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly	
245 250 255	
cta ggt tgg ggt aac aac gcc gcc gcc atc caa cgt gtc ggt ttg	816
Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu	
260 265 270	
ggt gaa atc atc aag ttc ggt agg atg ttc ttc cca gaa tcc aag gtg	864
Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val	
275 280 285	
gag act tac tac caa gaa tcc gca ggt gtt gct gac ttg atc acc acc	912
Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr	
290 295 300	
tgt tcc ggt ggt aga aac gtc cgt gtt gcc acc gaa atg gcc aag act	960
Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr	
305 310 315 320	
ggt aag agc ggt gag caa gtc gaa aaa gac atc ttg aac ggt caa tcc	1008
Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser	
325 330 335	
gct caa ggt ttg gtc acc tgt aag gaa gtt cac cag tgg tta gaa tct	1056
Ala Gln Gly Leu Val Thr Cys Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser	
340 345 350	
agt gga aac acc gaa gac ttc cca ttg ttc gag gct gtc tac cag atc	1104
Ser Gly Asn Thr Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile	
355 360 365	
act tac gaa aac gtg ccc atg aag gag ttg cca tct atg atc gaa gaa	1152
Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu	
370 375 380	
ttg gat atc gat agc aca tcg aag tgc gta ttg agt tac aag atg ggt	1200
Leu Asp Ile Asp Ser Thr Ser Lys Cys Val Leu Ser Tyr Lys Met Gly	
385 390 395 400	
ctc tag	1206
Leu	

<210> 14

<211> 401

<212> PRT

<213> Zygosaccharomyces rouxii

<400> 14

Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser Gln	
1 5 10 15	

Ser Met Lys Lys Thr Asp Ser Ser Met Ser Val Val Thr Ala Glu Asn	
20 25 30	

Pro Tyr Lys Val Ser Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile	
35 40 45	

Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln	
50 55 60	

Glu Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro	
65 70 75 80	

Leu Ala Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro
 85 90 95
 Asn Ile Asp Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ala
 100 105 110
 Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe
 115 120 125
 Leu Gly Arg Ile Val Ala Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Thr Ala
 130 135 140
 Arg Ala Val Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Glu Cys Gly
 165 170 175
 Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp
 180 185 190
 Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Asp Asp Phe Lys Gly Asp
 195 200 205
 Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro
 210 215 220
 Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly
 245 250 255
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu
 260 265 270
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val
 275 280 285
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr
 290 295 300
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser
 325 330 335
 Ala Gln Gly Leu Val Thr Cys Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser
 340 345 350
 Ser Gly Asn Thr Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile
 355 360 365
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu
 370 375 380
 Leu Asp Ile Asp Ser Thr Ser Lys Cys Val Leu Ser Tyr Lys Met Gly
 385 390 395 400
 Leu

<210> 15

<211> 1170

<212> DNA

<213> Zygosaccharomyces rouxii

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1167)
<223> coding for G3PDH
<400> 15

atg	gcc	gcc	act	gac	aga	tta	aac	caa	acc	tcc	gat	atc	cta	tct	cat	48
Met	Ala	Ala	Thr	Asp	Arg	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	Ser	His	
1	5								10					15		
tct	atg	aag	aag	act	gat	acc	tca	atg	tca	att	gtt	acc	gct	gag	aat	96
Ser	Met	Lys	Lys	Thr	Asp	Thr	Ser	Met	Ser	Ile	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	
									20	25				30		
cct	tac	aag	gtc	gct	gtt	gtc	ggt	tct	ggt	aac	tgg	ggt	acc	act	atc	144
Pro	Tyr	Lys	Val	Ala	Val	Val	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Thr	Ile	
									35	40				45		
gct	aag	gtt	gtt	gcc	gaa	aac	acc	aaa	gaa	aag	cca	gag	ttg	ttc	caa	192
Ala	Lys	Val	Val	Ala	Glu	Asn	Thr	Lys	Glu	Lys	Pro	Glu	Leu	Phe	Gln	
									50	55				60		
gga	cgt	gtg	gac	atg	tgg	gtt	ttc	gaa	gaa	caa	atc	gat	ggt	act	cca	240
Gly	Arg	Val	Asp	Met	Trp	Val	Phe	Glu	Glu	Gln	Ile	Asp	Gly	Thr	Pro	
									65	70				80		
ttg	act	caa	atc	atc	aac	acc	aaa	cac	caa	aac	gtc	aaa	tac	ctt	cca	288
Leu	Thr	Gln	Ile	Ile	Asn	Thr	Lys	His	Gln	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	Pro	
									85	90				95		
aac	atc	gat	ctt	ccg	ggg	aat	ttg	gtc	gct	aac	cca	gat	ttg	atc	tct	336
Asn	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Asn	Pro	Asp	Leu	Ile	Ser	
									100	105				110		
act	acc	aag	gac	gct	gat	gtc	atc	gtt	ttc	aac	gtt	cct	cac	caa	ttt	384
Thr	Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Val	Ile	Val	Phe	Asn	Val	Pro	His	Gln	Phe	
									115	120				125		
ttg	ggc	cgt	atc	gtt	tct	caa	atg	aag	ggt	caa	atc	aaa	cca	gat	gct	432
Leu	Gly	Arg	Ile	Val	Ser	Gln	Met	Lys	Gly	Gln	Ile	Lys	Pro	Asp	Ala	
									130	135				140		
cgt	gcc	atc	tcc	tgt	cta	aag	ggt	ttc	gaa	gtt	ggt	cca	aag	ggt	gtc	480
Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Pro	Lys	Gly	Val	
									145	150				160		
caa	cta	ctt	tct	gac	tac	gtc	act	caa	gaa	tta	ggt	atc	caa	tgt	ggt	528
Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Tyr	Val	Thr	Gln	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	Gly	
									165	170				175		
gcc	cta	tct	ggt	gct	aac	ttg	gct	cca	gaa	gtc	gcc	aag	gaa	cac	tgg	576
Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Lys	Glu	His	Trp	
									180	185				190		
tcc	gaa	act	acc	gtc	gct	tac	caa	gtc	cca	gat	gac	ttc	aag	ggt	gaa	624
Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	Gln	Val	Pro	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Glu	
									195	200				205		
ggt	aaa	gat	atc	gac	cac	cgt	gtc	ttg	aaa	caa	ttg	ttc	cac	aga	cca	672
Gly	Lys	Asp	Ile	Asp	His	Arg	Val	Leu	Lys	Gln	Leu	Phe	His	Arg	Pro	
									210	215				220		
tac	ttc	cac	gtc	aat	gtg	atc	gac	gat	gtt	gct	ggt	att	tct	atc	gca	720
Tyr	Phe	His	Val	Asn	Val	Ile	Asp	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	
									225	230				240		
ggt	gca	ttg	aag	aac	gtg	gtt	gcc	ttg	ggt	tgc	ggt	ttc	gtc	acc	ggt	768
Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Gly	Phe	Val	Thr	Gly	
									245	250				255		

ctt ggc tgg ggt aac aac gct gcc gcc atc caa cgt gtt ggt ttg Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu	260 265 270	816
ggt gaa atc atc aag ttc ggt aga atg ttc ttc cca gaa tcc aag gtg Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val	275 280 285	864
gaa act tac tac caa gaa tct gca ggt gtt gct gat ttg atc act acc Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr	290 295 300	912
tgt tcc ggt ggt aga aac gtt cgt gtc gcc act gaa atg gcc aag act Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr	305 310 315	960
ggt aag agc ggt gaa caa gtc gaa aag gac atc ttg aac ggt caa tcc Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser	325 330 335	1008
gct caa ggt ttg att act gct aag gaa gtc cac caa tgg ttg gaa tcc Ala Gln Gly Leu Ile Thr Ala Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser	340 345 350	1056
agc ggt cac acc gaa gaa tac cca ttg ttt gaa gcc gtc tac caa atc Ser Gly His Thr Glu Glu Tyr Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile	355 360 365	1104
act tac gaa aac gtg ccc atg aag gag ttg cca tcc atg atc gaa gaa Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu	370 375 380	1152
ttg gat atc gta gaa taa Leu Asp Ile Val Glu 385		1170
<210> 16		
<211> 389		
<212> PRT		
<213> Zygosaccharomyces rouxii		
<400> 16		
Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser His 1 5 10 15		
Ser Met Lys Lys Thr Asp Thr Ser Met Ser Ile Val Thr Ala Glu Asn 20 25 30		
Pro Tyr Lys Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile 35 40 45		
Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln 50 55 60		
Gly Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro 65 70 75 80		
Leu Thr Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro 85 90 95		
Asn Ile Asp Leu Pro Gly Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ser 100 105 110		
Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe 115 120 125		
Leu Gly Arg Ile Val Ser Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Asp Ala 130 135 140		

Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Gln Cys Gly
 165 170 175
 Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp
 180 185 190
 Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Val Pro Asp Asp Phe Lys Gly Glu
 195 200 205
 Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro
 210 215 220
 Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly
 245 250 255
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu
 260 265 270
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val
 275 280 285
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr
 290 295 300
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser
 325 330 335
 Ala Gln Gly Leu Ile Thr Ala Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser
 340 345 350
 Ser Gly His Thr Glu Glu Tyr Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile
 355 360 365
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu
 370 375 380
 Leu Asp Ile Val Glu
 385

<210> 17

<211> 8809

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: expression vector pSUN-USP containing Saccharomyces G3PDH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1017)..(2189)

<223> coding for G3PDH

<400> 17

```

aatattcaaa caaacacata cagcgcgact tatcatggac atacaatgg acgaacggat 60
aaacctttc acgcccttt aaatatccga ttattctaatt aaacgctctt ttctcttagg 120
tttaccggcc aatatatcct gtcaaacact gatagttaa actgaaggcg ggaaacgaca 180

```

atcagatcta gtaggaaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcttgcac gcctgcagg 240
 cgactctaga ctagtggttc cgatatcgcc cgggctcgag gtaccgagct cgaattcgcc 300
 gcgccgagct cctcgagcaa atttacacat tgccactaaa cgtctaaacc cttgttaattt 360
 gtttttgttt tactatgtgt gttatgtatt tgatttgcga taaattttt tatttggtag 420
 taaaatttata acacctttta tgctaacgtt tgccaaacact tagcaatttgc caagtgtt 480
 aattgattct aaatttattt tgtcttctaa atacatatac taatcaactg gaaatgtaaa 540
 tatttgcataa tatttctact ataggagaat taaagttagt gaatatggta ccacaagggtt 600
 tggagattta attgttgcaa ttagtgcattt atggcatata cacaaacat tcaataattc 660
 ttgaggataa taatggtacc acacaagatt tgaggtagt gaacgtcactg tggacaaaag 720
 gtttagtaat ttttcaagac aacaatgtt ccacacacaa gttttgagggt gcatgcattt 780
 atgccctgtg gaaagttaa aaatattttg gaaatgattt gcatggaagc catgtgtaaa 840
 accatgacat ccacttggag gatgcaataa tgaagaaaaac tacaaatttgc catgcaacta 900
 gttatgcattt tagtctataat aatgaggatt ttgcaataact ttcatcata cacactcact 960
 aagtttaca cgattataat ttcttcatacg ccagcccacc gcgggtggcg gccgccccatgt 1020
 ctgctgctgc tgatagatta aacttaactt ccggccactt gaatgtgtt agaaagagaa 1080
 gttcctcttc tgtttctttg aaggctgccc aaaagcctt caaggttact gtgattggat 1140
 ctggtaactg gggtaactt attgccaagg tggttgcga aaattgttaag ggatacccg 1200
 aagtttgcgc tccaatagta caaatgtggg tgttcgaaga agagatcaat ggtaaaaat 1260
 tgactgaaat cataaataact agacatcaaa acgtgaaata cttgcctggc atcactctac 1320
 ccgacaattt ggttgcataa ccagacttgc ttgattcagt caaggatgtc gacatcatcg 1380
 tcttcaacat tccacatcaa tttttgcccc gtatctgttag ccaatttgc ggtcatgtt 1440
 attcacacgt cagagctatc tcctgtctaa agggtttgc agttgggtgtt aaagggtgtcc 1500
 ctaacattgc cactgaagtc gctcaagaac actggctctga aacaacagtt gcttaccaca 1620
 ttccaaagga tttcagaggc gagggcaagg acgtcgacca taagggttcta aaggcctt 1680
 tccacagacc ttacttccac gtttagtgc tgcggatgt tgctggatc tccatctgt 1740
 gtgcttgaa gaacgttgc ttcttaggtt gtgggttcgt cgaagggtcta ggctgggta 1800
 acaacgcttc tgctgccatc caaagagtcg gttttgggtga gatcatcaga ttccgtcaaa 1860
 tgttttccc agaatctaga gaagaaacat actaccaaga gtctgctgtt gttgctgatt 1920
 tgatcaccac ctgcgctgtt ggtagaaacg tcaagggttgc taggctaattt gctactctg 1980
 gtaaggacgc ctggaaatgt gaaaagggt tggttgcattt ccaatccgtt caagggtt 2040
 ttacctgcaa agaagttcac gaatgggtgg aaacatgtgg ctctgtcgaa gacttccat 2100
 tatttgaagc cgtataccaa atcgttaca acaactaccc aatgaagaac ctgcccggaca 2160
 tgattgaaga attagatcta catgaagatt aggccggccgc ctgcagtcta gaaggcctcc 2220
 tgctttaatg agatatgcga gacgcctatg atcgcatgtt atttgcattt aattctgtt 2280
 tgcacgttgc aaaaaacctg agcatgtgtt gctcagatcc ttaccggccgg ttccgttca 2340
 ttctaatttgc tatatcaccat gttactatcg tattttatg aataatattt tccgttcaat 2400
 ttactgatttgc tccgtcgacg aatttactgg ccgtcggtt acaacgactc agagcttgc 2460
 aggaggcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga taattttatcc tagttgcgc 2520
 gctatatttt gttttctatc gcgttataaa tgtataattt cgggactctt atcataaaaa 2580
 cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattt tacatgctt acgttaatttca 2640
 acagaaattt tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt 2700
 attgccaaat gtttgaacga tcggggatca tccgggtctg tggcgaaac tccacgaaaa 2760
 tatccgaacg cagcaagatc tagagcttgg gtccgcgtca gaagaactcg tcaagaaggc 2820
 gatagaaggc gatgcgctgc gaatcggtgg cggcgatacc gtaaagcactg aggaagcggt 2880
 cagccatttgc gccgccaagc tcttcagcaaa tatcacgggt agccaaacgt atgtcctgt 2940
 agcggtccgc cacacccaggc cggccacagt cgatgaatcc agaaaaggccg ccattttcca 3000
 ccatgatattt cggcaagcagg gcatgcattt gtgtcactgc gagatcctcg ccgtcgggca 3060
 tgcgcgcctt gagcctggcg aacagttcg tggcgccgg cccctgatgc ttccgttca 3120
 gatcatcctg atcgacaaga ccggcttcca tccgagttactg tgctcgctcg atgcgtt 3180
 tcgcttgggtg gtcgaatggg caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgatttgc 3240
 cagccatgtt ggtttttc tcggcaggag caagggtgaga tgacaggaga tcctgcccc 3300
 gcacttcgccc caatagcaggc cagttccatc ccgcatttgc gacaacgtcg agcacagctg 3360
 cgcaaggaac gcccgtcgatc gccagccacg atagccgcgc tgctcgatcc tgcaaggatcc 3420
 tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa aaagaaccgg gcgccccctgc gctgacagcc 3480
 ggaacacggc ggcattcagag cagccgatttgc tctgttgc ccagtcatag ccgaatagcc 3540
 tctccacccaa agcggccggaa gaaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg 3600

atccagatcc ggtgcagatt atttggattt agagtgaata tgagactcta attggatacc 3660
 gagggaaatt tatggaacgt cagtggagca ttttgaccaa gaaatatttgc tagctgata 3720
 gtgacccttag gcgacttttgc aacgcgcaat aatggtttgc gacgtatgtc cttagctcat 3780
 taaaactccag aaaccgcgg ctgagtggct cttcaacgt tgccgttctg tcagttccaa 3840
 acgtaaaacg gcttgcggcc cgcatcgcc ggggtcata acgtgactcc cttaaattctc 3900
 cgctcatgtat cagattgtcg tttccgcct tcagttaaa ctatcagtgt ttgacaggat 3960
 cactgcttgg taataattgt cattagattt ttttatgca tagatgcact cgaaatcagc 4020
 caattttaga caagtatcaa acggatgtta attcagtaca taaaagacgt ccgcaatgt 4080
 ttattaagtt gtctaagcgt caatttgc acaccacaat atatcctgcc accagccagc 4140
 caacagctcc ccgaccggca gctcggcaca aaatcaccac gcgtctaagg aggtgatgt 4200
 tattttagta aaacagcttgc cgcatgcgg tcgctgcgtat tatgatgcga tgtagtaata 4260
 aacaaatacg caaggggaac gcatgaaggat tatcgctgtat cttaaaccaga aaggcgggtc 4320
 aggcaagacg accatcgcaa cccatctagc ccgcgcctg caactcgccg gggccgatgt 4380
 tctgttagtc gattccgatc cccagggcag tgcccgcgtat tggcggccg tgcgggaaga 4440
 tcaaccgcta accgttgcgc gcatcgaccg cccgacgatt gaccgcgacg tgaaggccat 4500
 cggccggcgc gacttcgttag tgatcgacgg agcgcggccag gcggcggact tggctgtgtc 4560
 cgcgatcaag gcagccgact tcgtgctgtat tccgggtcag ccaagccctt acgacatatg 4620
 ggccaccggcc gacctgggtgg agctggtaa gcagcgcatt gaggtcacgg atggaaggct 4680
 acaagcggcc tttgtcgtgt cgccggcgtat caaaggcacg cgcatcggcg gtgaggttgc 4740
 cgaggcgctg gccgggtacg agctgcccatt tcttgagtcc cgtatcacgc agcgcgttag 4800
 ctaccaggc actgcccggcc cggcacaac cgttcttgcgaa tcagaaccgc agggcgacgc 4860
 tgccccgcgag gtccaggcgc tggccgtgtat aattaaatca aaactcattt gagttaatga 4920
 ggtaaaagaga aaatgagcaa aagcacaaac acgctaagtgc cggccgtcc gagcgcacgc 4980
 agcagcaagg ctgcaacgtt ggccagcctg gcagacacgc cagccatgaa gcgggtcaac 5040
 tttcagttgc cggcggagga tcacaccaag ctgaagatgt acgcggtagt ccaaggcaag 5100
 accattaccg agctgctatc tgaatacatc gcgcagctac cagagtaat gagcaaatga 5160
 ataaatgagt agatgaattt tagcggctaa aggaggcggc atgaaaaatc aagaacaacc 5220
 aggcaccgc gccgtggaaat gccccatgtg tggaggaacgc ggcgggtggc caggcgtaag 5280
 cggctgggtt gtctgccggc cctgcaatgg cactggaaacc cccaagccgc aggaatcggc 5340
 gtgagcggc gcaaaccatc cggccggta caaatcggcg cggcgctggg tgatgacctg 5400
 gtggagaagt tgaaggccgc gcagggccgc cagcggcaac gcacgcggc agaagacgcc 5460
 cccgtgaatc gtggcaaggg gcccgtgtat gaatccgaa agaatcccgg caaccgcgg 5520
 cagccgggtgc gccgtcgatt aggaagccgc ccaaggcgatc cgaccaacca gatttttcg 5580
 ttccgatgtct ctatgacgtg ggcacccgcg atagtcgcag catcatggac gtggccgtt 5640
 tccgtctgtc gaagcgtgac cgacgagctg gcgaggtgtat ccgctacgcg cttccagacg 5700
 ggcacgtaga gtttccgca gggccggccg gcatggccag tgtgtggat tacgacctgg 5760
 tactgatggc gtttcccat ctaaccgaat ccatgaaccgc ataccggaa gggaaaggag 5820
 acaagccgg cccgtgttc cgtccacacgc ttgcggacgt actcaagttc tgccggcgag 5880
 ccgatggcgg aaagcagaaa gacgacctgg tagaaacctg cattcggtt aacaccacgc 5940
 acgttgcatt gcagcgtacg aagaaggcca agaacggccg cctgggtacgc gtatccgagg 6000
 gtgaaggcatt gattagccgc tacaagatgcg taaagagcga aaccggcgcc cggagataca 6060
 tcgagatcga gctagctgtat tggatgtacc gcgagatcac agaaggcaag aaccggacgc 6120
 tgctgacggcgt tcaccccgat tacttttgc tcgatcccgg catggccgt tttctctacc 6180
 gcctggcacc cccgcggca ggcaggcag aagccagatg gttgtcaag acgatctacg 6240
 aacgcagtgg cagcggccggaa gagttcaaga agttctgttt caccgtgcgc aagctgatgc 6300
 ggtcaaatacg cctgcccggat tacgatttgc aggaggaggc gggcaggct gcccgcattcc 6360
 tagtcatgcg ctaccgcaac ctgatcgagg gcgaagcatc cggccgttcc taatgtacgg 6420
 agcagatgtc agggcaaatt gccctagcag gggaaaaagg tcgaaaaggat ctcttcctg 6480
 tggatagcac gtacattggg aacccaaagc cgtacattgg gaaccggaaac ccttacattg 6540
 ggaacccaaatt gccgtacatt gggaaaccggc cacacatgtt agtgcactgtat ataaaagaga 6600
 aaaaaggcga ttttccgca taaaactctt taaaacttat taaaactctt aaaacccggcc 6660
 tggcctgtgc ataactgtct ggccagcgc cagccgaaga gctgcaaaaaa gcccgcattcc 6720
 ttcggcgtcgat gcgctcccta cggccggccg cttcgctcg gcctatcgcc gcctatgcgg 6780
 tgtgaaatacg cgcacagatg cgttaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc 6840
 tcgctcactg actcgctgcg ctcggcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca 6900
 aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg cagggaaagaa catgtgagca 6960
 aaaggccagc aaaaggccagc gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg 7020

ctccgcccccttgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcggaaacccg 7080
 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcgct cttccctgtt 7140
 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgaaag cgtggcgctt 7200
 tctcatagct cacgctgttag gtatctcagt tcggtgttagg tcgttcgctc caagctggc 7260
 tgtgtgcacg aaccccccgt tcagccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgctt 7320
 gagtccaacc cgtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 7380
 agcagagcga ggtatgttagg cggtgctaca gagttcttga agtggtgccc taactacggc 7440
 tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcgaaaaa 7500
 agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg ttttttgtt 7560
 tgcaaggcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatctttct 7620
 acggggctcg acgctcagtgcg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgtt catgcatgt 7680
 atatctccca atttgtgttag ggcttattat gcacgcttaa aaataataaa agcagactt 7740
 acctgatagt ttggctgtga gcaattatgt gcttagtgca tctaacfctt gagttagcc 7800
 gcgcgcgaa gcggcgctgg cttgaacgaa tttctagcta gacattattt gccgactacc 7860
 ttggtgatct cgccttcac gtagtgaca aattcttcca actgatctgc ggcgaggcc 7920
 aagcgatctt cttcttgcgc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac gggctgatac 7980
 tggccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat cttcggcgc gattttgccg 8040
 gttactgcgc tgtaccaaattt gcccggacaac gtaagcacta catttcgctc atgcgcagcc 8100
 cagtcggcgc gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta gcgcctcaaa tagatcctgt 8160
 tcaggaaccg gatcaaagag ttccctccgccc gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct 8220
 cttgcttttgc tagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc gaagataacct 8280
 gcaagaatgt cattgcgtgc ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc tggataacgc 8340
 cacggaatga tgtcgctgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgccggag aatctcgctc 8400
 tctccagggg aagccgaatgttccaaaagg tcgttgatca aagctcgccg cttgtttca 8460
 tcaaggcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt caggccgcca 8520
 tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg gttcgagatg gcgctcgatg 8580
 acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc ccccatgatg 8640
 ttaacttttgcg ttttagggcg actgcctgc tgcttaacat cttgtctgtt ccataacatc 8700
 aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttgatg cccgaggcat agactgtacc 8760
 ccaaaaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accggccactg cttccatg 8809

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 18

acttagtatgt ctgctgctgc tgatag

26

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 19

ctcgagatct tcatgttagat ctaatt

26

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 20
gcggccgcca tgtctgctgc tgctgatag 29
<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 21
gcggccgcat cttcatgtag atctaatt 28
<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive
<220>
<221> VARIANT
<222> (8)
<223> Thr
<400> 22
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys
1 5 10
<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive
<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Gln
<400> 23
His Glu Gln Asn Val Lys Tyr Leu
1 5
<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive
<220>
<221> VARIANT
<222> (1)
<223> Asn
<220>
<221> VARIANT

<222> (2)
<223> Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)
<223> Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)
<223> Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)
<223> Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)
<223> Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)
<223> Leu or Ile

<400> 24
Asp Ile Leu Val Phe Val Leu Pro His Gln Phe Val
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)
<223> Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)
<223> Ile

<400> 25
Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly
1 5

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)
<223> Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)
<223> Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)
<223> Ile

<400> 26
Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Xaa Glu Val Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)
<223> Val

<400> 27
Leu Phe Xaa Arg Pro Tyr Phe Xaa Val
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Met

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)
<223> Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)
<223> Ile

<220>
<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)

<223> Lys or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)

<223> Ser or Ala

<400> 28

Gly Leu Leu Glu Met Ile Arg Phe Gly

1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)

<223> Ile

<400> 29

Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn

1 5 10 15

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)

<223> Arg

<400> 30

Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)
<223> Val

<400> 31
Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)
<223> Val

<400> 32
Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu
1 5 10

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)
<223> Thr

<400> 33
Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala
1 5 10

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<400> 34
Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (?)
<223> Arg

<400> 35
Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly
1 5

<210> 36
<211> 13718
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: expression
vector pGPTV-gpd1

<220>
<221> promoter
<222> (10807)..(11951)
<223> napin promoter

<220>
<221> terminator
<222> (13154)..(13408)
<223> nos terminator

<220>
<221> misc_feature
<222> (11962)..(13137)
<223> coding for yeast G3PDH (gpd1)

<400> 36
gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgcca 120
tagtggcgg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcacccggc 180
ataatcaggc cgatgcccac agcgtcgagc ggcacagtgc tcagaattac gatcagggtt 240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattt aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgttcc gtgcgcctt ggacctgtt aacgaggtcg 420
gcgttagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggtt ggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cgaggaaatca tacgcattcg gtgcgcgag ccgacgcga ctggcgctca tttctgtatcg 600
ggaatccccg cagttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcc cgcatccatg 660
ccggcacgcg accggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgccgcgcg cgcgcgcgc 720
gcgaggcggg ttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgc tgcgcgcgacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgcgcgtt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtcggc cgcagcggtc gagcaggac tcgcgggtat tgctgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcg tgcgttggaaac gttgaaggac cgagaaagggt tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtt acaacatccc ctccccctt 1080
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgc tacggcttt ttcatgcctt gccctagcgt 1140
ccaaggctca cggccgcgtc cggcctctt ggcggccttc tggcgcttt ccgccttc 1200
gctcaactgac tcgctgcgtc cggcgttgc gctgcggcga gcggtatcag ctcactaaa 1260
ggcggtaata cggtatcca cagaatcagg ggataacgcga ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaaa ggccgcgtt ctggcggtt tccataggct 1380
ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgttcccccc tggaagctcc ctcgtgcgtc ctctgttcc 1500
gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ctgtccctt tcggaaagcg tggcgcttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgattt ttccgttat ccatcctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaagggt ttcgtgtaga ctggcgatcc 1680

ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gcccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttgcacactg gcgggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggccggcggc ggccggcatg agcctgtcg cctacactgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tcccgagct ggccgcac aatggcgacc 2040
 tggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgccgt 2100
 tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagctt 2160
 gcaaggtcat gatggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgactttt tagccctaa 2220
 aacggccggg gggtgcgcgt gattGCCAG cacgtccccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgcgg agctggtaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gccccttgc 2340
 gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgccgcagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcggc gttgtggata 2460
 cctcgccgaa aacttggccc tcactgacag atgagggcgc gacgttgaca cttgagggc 2520
 cgactcaccc ggccggcgt tgacagatga gggcaggct cgatttcggc cggcgcacgt 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcaaaaa cgcctgatt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggta taagtgcct gcggatttga cacttgggg gcgactac 2700
 tgacagatga gggcgcgtat cttgacact tgagggcag agtgcgtaca gatgagggc 2760
 gcacctattt acatttgggg ggctgtccac aggcaaaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgtt ttcggccacc gctaacctgt ctttaacctt gctttaaac caatattt 2880
 aaaccttgtt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaaggggg 2940
 tgccccccct tctcgaaccc tccggcccg ctaacgcggg cctccatcc cccagggc 3000
 tgcccccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca 3060
 ttgcgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgcgggc agtggggc 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacf gacttcatgg 3240
 cggggccggc aattttacc ttggcattt ttggcatagt ggtcgccggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgggtt ataggtttaa ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaatttggc ctttacaga attactctat gaagcgccat attaaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatac aagatatcgc cgtatgttaa gatttcagg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atggcaaaag cataaaaaact 3600
 tgcattggact aatgcttgc acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attggtaat gactccaact tattgatgt gtttatgtt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccat tttgagaacg acagcgact ccgtcccagc cgtgccagg 3780
 gctgcctcag attcaggtt tgccgtcaa ttgcgtcgt atatcgctt ctgattacgt 3840
 gcagcttcc ttccaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaagg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cggtcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccattt cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggccttag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgggg ccaacgccc taatgcggc tggcccccgg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgttaagtga actgcagtt 4260
 ccatgtttt cggcagttag agcagagata gcgcgtatgt ccggcgggtc ttttggcgtt 4320
 acgcaccacc cgcgtcactg ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagt ggcagcatca cccataattt 4440
 tggtttcaaa atcggtccg tcgataactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctgtt ttctggatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaaggaa gtctcctgct aaggatata agctgggtgg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggAACGG 4800
 gaaaaggaca tggatgtatg gctggaaaggaa aagctgcctg ttccaaaggat cctgcactt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtggagg ccgatggcgt ccttgctcg 4920
 gaagagttatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcata 4980
 aggcttttc actccatcga catatcgat tgcctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattt cgaaaactgg 5100

gaagaagaca ctccattaa agatccgcgc gagctgtatg atttttaaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctggag acagaacat ctttgtaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg ggaaagaaca gtatgtcag 5340
 ctattttg acttactggg gatcaagcct gattggaga aaataaaata ttatattta 5400
 ctggatgaat tgtttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcata agtgtttgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggat tcgtgcaggg caagattcg aataccaat acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggg ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggg gggtaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgttag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggtaatga atcggacgtt tgaccggaaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg tttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccc tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttcagg ccgtcggtc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacacg gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccattggccg ccgtggagcg 5940
 ttcgcgtcgt ctcgaacagg aggccggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggttag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttccttggc gatattgcgc cgtggccgg aacatggccgaa cacgatgcga gcgatgccaa acgacacgcg 6180
 ccgctctgcc ctgttacca cgcgcaacaa gaaaatcccgcg cgcgaggcgcc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactgggt ggcagcagg gttggagtac gcgaagcgca cccctatcg 6360
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctggcgttgt cgatcaatgg 6420
 ccggattttc acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatggcgtt 6480
 cacgtccgac cgcgttggc acctggaatc ggtgtcgctg ctgcaccgc tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcgcac 6660
 ggccgcacgg atgttcgact atttcagctc gcaccggag ccgtacccgc tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggttcc caccggcgtg aagaagtggc gcgagcagg 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggtaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggact gtcgacgc tttgcgtcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgc cggcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattt tgattaaggc tcagattcg a cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcgcc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagccat ggaggcggtc gctgaacgg tgcgagatgc cgtggcatttc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gtttcgtgg agccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgccg gtatgctgct gcggcggtt ccggcgggtt tattgctgt gatgatgc 7380
 cgacagatttcc acacggaaat ctgggtggatc cgcatctca tcctcgccgc acttaatatt 7440
 tcgctattct ggagcttgg ttttatttcg gtctaccgc tgccggcg ggtcgccgc 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatct ctggcgctc gctaggtac 7560
 ccgatacgat tgcgtggcgtt cctggggctt atttgcggaa ctgcggcggt ggcgtgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggcg 7680
 gtttccatgg ctttcggaaac cgtgtcgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggccggccgaa ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcg 7860
 ctgatcgag cgggttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgact actcgaaacct 7920
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagg cccagatctg ggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttegggtcc cgcacgtgtt ccattcggtg agcaatggat 8040
 agggagttt atatcgtaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
 cggcttatac cagcgatttc ctattatgtc ggcatacgatc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggtaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcattccgtgt ttcaaaacccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccggc ctgatggctt 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgcccggat ctggcggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520

gacgtttta atgtactggg gtgggtttc tttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgccctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcggca 8640
 gcaggcgaaa atcctgttg atgggtggtc cgaaatcgcc aaaatccct ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccaactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gtttttggg gtcgagggtgc cgtaaaagcac taaatcgaa 8880
 ccctaaagg agcccccgat ttagagctt acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcactgt tggaagggc 9000
 gatcggtgcg ggcctttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtAACGCCA gggtttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaatattt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcg ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgttaatac ataaattgtat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgcgtgcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggttagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgcccac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcg caagcaggca 9600
 tcgcccattgg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaaac 9660
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctc tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
 gtagccggat caagcgatg cagccgcccgc attgcattcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttecgcccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgccc cgctgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctcgtcctgc agttcattca gggcaccggc caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccggc acacggcgcc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtccca gtcatagccg aatagcctct ccacccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttgc ttcaatccaa gctcccatgg gcctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg agggaaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgcacaa aatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgactttga 10320
 acgcgcaata atggttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aacccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcgggtctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc 10440
 gtcatcgccg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccct 10500
 ggcgcattcag atcctggcg gcaagaaagc catccagtt acttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgcggccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgccc 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gcccactgca agctacctgc tttctcttt cgcttgcgtt 10680
 ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggcttc tacgtttcc gcttcctta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcggca 10800
 gctgtgaagct ttcttcatcg gtgattgatt cttttaaaga cttatgtttc ttatcttgct 10860
 tctgaggcaa gtattcagtt accagttacc acttatattc tggactttct gactgcattcc 10920
 tcattttcc aacattttaa atttcaactat tggctgaatg cttcttctt gaggaagaaa 10980
 caattcagat ggcagaaaatg tatcaaccaa tgcatatata caaatgtacc tcttgttctc 11040
 aaaacatcta tcggatggtt ccatttgctt tgtcatccaa ttagtgacta ctttatattta 11100
 ttcactcctc tttattacta tttcatcg aggttgcct gtacattata tttgtaaagga 11160
 ttgacgctat tgagcgttt tcttcaattt tcttatttt agacatgggt atgaaatgtg 11220
 tgtagagtt ggggtgaatg agatatacgt tcaagtgaat ggcataccgt tctcgagtaa 11280
 ggtatgaccta cccattcttg agacaaatgt tacattttag tatcagagta aaatgtgtac 11340
 ctataactca aattcgattt acatgtatcc attcaacata aaattaaacc agcctgcacc 11400
 tgcattccaca tttcaagttt tttcaaaccg ttccgctcct atccaccggg tggtaacaaga 11460
 cggattccga atttggaaaga ttttgcactca aattccaaat ttatattgac cgtgactaaa 11520
 tcaactttaa cttctataat tctgattaag ctcccaattt atattcccaa cgccactacc 11580
 tccaaaattt atagactctc atccccttt aaaccaactt agtaaacgtt tttttttta 11640
 attttatgaa gttaagttt taccttgc ttaaaaagaa tcgttcataa gatgccatgc 11700
 cagaacatta gctacacgtt acacatagca tgcagccgca gagaattgtt tttcttcgccc 11760
 acttgcgtact cccttcaaacc acctaagagc ttctctctca cagcacacac atacaatcac 11820
 atgcgtgcat gcattattac acgtgatcgc catgcaaatc tcctttatag cctataaatt 11880
 aactcatccg cttcactctt tactcaaacc aaaactcatc aatacaaca agattaaaaa 11940

catacacgag gatccactag tatgtctgct gctgctgata gattaaacctt aacttccggc 12000
 cacttgaatg ctggtagaaa gagaagttcc tcttctgttt ctttgaaggc tgccgaaaag 12060
 ccttcagg ttactgttat tggatctggta aactgggta ctactattgc caaggtggtt 12120
 gccgaaaatt gtaaggata cccagaagtt ttcgctccaa tagtacaaat gtgggtttc 12180
 gaagaagaga tcaatggta aaaattgact gaaatcataa atactagaca tcaaaaacgtg 12240
 aaatacttgc ctggcatcac tctaccgac aatttggttt ctaatccaga cttgatttat 12300
 tcagtcaagg atgtcgacat catcgcttc aacattccac atcaattttt gccccgtatc 12360
 tgttagccaat tgaaaggtca tggattca cacgtcagag ctatctcctg tctaaagggt 12420
 tttgaagttg gtgctaaagg tgtccaattt ctatcctctt acatcactga ggaacttaggt 12480
 attcaatgtg gtgctctatc tggtgctaac attgccactg aagtgcgtca agaacactgg 12540
 tctgaaacaa cagttgctta ccacattcca aaggattca gaggcgaggg caaggacgtc 12600
 gaccataagg ttctaaaggc ttgttccac agacctact tccacgttag tgtcatcgaa 12660
 gatgttgctg gtatctccat ctgtggtgct ttgaagaacg ttgttgcctt aggttgtgg 12720
 ttcgtcgaag gtctaggctg gggtaacaac gcttctgctg ccattccaaag agtcggttt 12780
 ggtgagatca tcagattcgg tcaaattttt ttcccagaat cttagagaaga aacataactac 12840
 caagagtctg ctgggtttgc tgatttgc accacctgcg ctgggttag aaacgtcaag 12900
 gttgctaggc taatggctac ttctggtaag gacgcctggg aatgtaaaaa ggagttgttg 12960
 aatggccaaat ccgctcaagg ttaattacc tgcaaagaag ttacacgaatg gttggaaaca 13020
 tgtggctctg tcgaagactt cccattattt gaagccgtat accaaatcgt ttacaacaac 13080
 tacccaatga agaacctgcc ggacatgattt gaagaattttt atctacatga agattagctc 13140
 gacgaatttc cccgatcggtt caaacattt gcaataaaagt ttcttaagat tgaatcctgt 13200
 tgccggctt gcgtatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtataat 13260
 taacatgtaa tgcgtacgt tattttatgag atggttttt atgatttagag tcccgcaatt 13320
 atacattaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcga aactaggata aattatcg 13380
 cgccgtgtca tctatgttac tagatcgga attcagatcg gctgagtggc tccttcaacg 13440
 ttgcggntct gtcagncca aacgtaaaac gggttggc gcggnatcgg gcggggggcc 13500
 ttaaccgtgn actnccntna ttncctccggc ttcantgnnn agaattggnc ntttccccgn 13560
 cntcagttta aactatcagg tggggacag gatattttt gcggtaaac ctaaganaaa 13620
 agagcgttta tttagataat cgatattta aaaggccgn gaaaaggttt atcccttccg 13680
 tccatttgc tgngcatgcc naccaccagg gttccccca 13718

<210> 37

<211> 1254

<212> DNA

<213> *Emericella nidulans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1251)

<223> coding for G3PDH

<400> 37

atg	ggc	tct	ctt	gga	ccg	tat	aag	caa	aag	cac	aag	gtg	act	gtg	gtg	48
Met	Gly	Ser	Leu	Gly	Pro	Tyr	Lys	Gln	Lys	His	Lys	Val	Thr	Val	Val	
1			5					10					15			

gga	tcg	ggt	aac	tgg	ggc	acc	gct	ata	gcc	aaa	atc	gtc	gcc	gag	aat	96
Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Lys	Ile	Val	Ala	Glu	Asn	
				20				25				30				

act	gcc	agc	aac	cct	gcg	gtc	ttt	gag	aag	gat	gtt	cag	atg	tgg	gtt	144
Thr	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Val	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Gln	Met	Trp	Val	
				35			40				45					

ttc	gag	gaa	aag	gtc	gag	att	ccg	aaa	tcg	tcg	aag	cat	tat	gat	cct	192
Phe	Glu	Glu	Lys	Val	Glu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Lys	His	Tyr	Asp	Pro	
				50			55			60						

gcc	tct	tct	ctt	tgc	cag	ggc	ccg	cag	aat	ctg	aca	gat	att	atc	aac	240
Ala	Ser	Ser	Leu	Cys	Gln	Gly	Pro	Gln	Asn	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Asn	
				65			70			75			80			

cat acc cat gag aat atc aag tac ctc ccc gga att acc ctt ccg gaa		288	
His Thr His Glu Asn Ile Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Thr Leu Pro Glu			
85	90	95	
aac ttg att gcc aat cca tcg cta gtc gac gcg gtt caa gac agc act		336	
Asn Leu Ile Ala Asn Pro Ser Leu Val Asp Ala Val Gln Asp Ser Thr			
100	105	110	
atc ctc gtc ttc aac cta ccc cat caa ttc atc atc aat att tgt gaa		384	
Ile Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Ile Ile Asn Ile Cys Glu			
115	120	125	
cag atc aag ggc aag att gtc cca tac gcg cgt gga att tct tgc ata		432	
Gln Ile Lys Gly Lys Ile Val Pro Tyr Ala Arg Gly Ile Ser Cys Ile			
130	135	140	
aag ggc gtg gat gtg aat gag gaa gga gtc cac ctg ttt tcc gaa aca		480	
Lys Gly Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Val His Leu Phe Ser Glu Thr			
145	150	155	160
att gga aag att ctc ggg atc tac tgt ggc gcc ctg tcc ggt gcc aac		528	
Ile Gly Lys Ile Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn			
165	170	175	
atc gcg aat gag gtc gcc cag gaa aag tgg tcc gag tct agc att ggt		576	
Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln Glu Lys Trp Ser Glu Ser Ser Ile Gly			
180	185	190	
tat gat cca ccg cat ttt gac tct aaa gcc cct tct cct ccc aac cga		624	
Tyr Asp Pro Pro His Phe Asp Ser Lys Ala Pro Ser Pro Pro Asn Arg			
195	200	205	
tcc cct tcc gca tcg act gac aat atc ctg cac ttc gag cac aaa gac		672	
Ser Pro Ser Ala Ser Thr Asp Asn Ile Leu His Phe Glu His Lys Asp			
210	215	220	
gtt tcg ggt caa ctt tcg cgg gta aag cta cag gct cta cct tcc gaa		720	
Val Ser Gly Gln Leu Ser Arg Val Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Glu			
225	230	235	240
ttt cct ccc atc gac cat gcc ctt ctc aag tcg cta ttc cac cgt cct		768	
Phe Pro Pro Ile Asp His Ala Leu Leu Lys Ser Leu Phe His Arg Pro			
245	250	255	
tac ttc cat att ggt gtg gta agt gac gtc gca ggt gtt tcg tta gga		816	
Tyr Phe His Ile Gly Val Val Ser Asp Val Ala Gly Val Ser Leu Gly			
260	265	270	
ggt gcc ctt aag aat gtc gtt gct gtc gcg gca ggg tgg gtt gtg ggc		864	
Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Val Ala Ala Gly Trp Val Val Gly			
275	280	285	
aaa gga tgg gga gac aat gcg aag gct gca att atg cga gtt ggg ctt		912	
Lys Gly Trp Gly Asp Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Val Gly Leu			
290	295	300	
ttg gaa atg gtg aag ttc ggc gaa cag ttt ttc ggt gct acc atc aac		960	
Leu Glu Met Val Lys Phe Gly Glu Gln Phe Phe Gly Ala Thr Ile Asn			
305	310	315	320
act cgc acc ttc act gaa gaa agt gct ggt gtt gcc gat cta atc acg		1008	
Thr Arg Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr			
325	330	335	
agt tgc agt ggc gga cga aac ttc cgc tgc gca aag ctt agc att gaa		1056	
Ser Cys Ser Gly Gly Arg Asn Phe Arg Cys Ala Lys Leu Ser Ile Glu			
340	345	350	

aga aac cag ccg att gag aaa atc gag gag aca gag ttg aac ggc cag		1104	
Arg Asn Gln Pro Ile Glu Lys Ile Glu Glu Thr Glu Leu Asn Gly Gln			
355	360	365	
aag ctg caa ggc act ttg act gca gtc gaa gtc aac agt ttc ttg aaa		1152	
Lys Leu Gln Gly Thr Leu Thr Ala Val Glu Val Asn Ser Phe Leu Lys			
370	375	380	
aag caa ggt tta gaa gaa gag ttc cca ttg ttt act gca gtc tac cga		1200	
Lys Gln Gly Leu Glu Glu Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr Arg			
385	390	395	400
gtt ctt caa ggc acc atg tct gtg gac gag att cct tct ttc att gag		1248	
Val Leu Gln Gly Thr Met Ser Val Asp Glu Ile Pro Ser Phe Ile Glu			
405	410	415	
cg _g taa		1254	
Arg			
<210> 38			
<211> 417			
<212> PRT			
<213> Emericella nidulans			
<400> 38			
Met Gly Ser Leu Gly Pro Tyr Lys Gln Lys His Lys Val Thr Val Val			
1	5	10	15
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Val Ala Glu Asn			
20	25	30	
Thr Ala Ser Asn Pro Ala Val Phe Glu Lys Asp Val Gln Met Trp Val			
35	40	45	
Phe Glu Glu Lys Val Glu Ile Pro Lys Ser Ser Lys His Tyr Asp Pro			
50	55	60	
Ala Ser Ser Leu Cys Gln Gly Pro Gln Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn			
65	70	75	80
His Thr His Glu Asn Ile Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Thr Leu Pro Glu			
85	90	95	
Asn Leu Ile Ala Asn Pro Ser Leu Val Asp Ala Val Gln Asp Ser Thr			
100	105	110	
Ile Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Ile Ile Asn Ile Cys Glu			
115	120	125	
Gln Ile Lys Gly Lys Ile Val Pro Tyr Ala Arg Gly Ile Ser Cys Ile			
130	135	140	
Lys Gly Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Val His Leu Phe Ser Glu Thr			
145	150	155	160
Ile Gly Lys Ile Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn			
165	170	175	
Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln Glu Lys Trp Ser Glu Ser Ser Ile Gly			
180	185	190	
Tyr Asp Pro Pro His Phe Asp Ser Lys Ala Pro Ser Pro Pro Asn Arg			
195	200	205	
Ser Pro Ser Ala Ser Thr Asp Asn Ile Leu His Phe Glu His Lys Asp			
210	215	220	
Val Ser Gly Gln Leu Ser Arg Val Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Glu			
225	230	235	240

Phe Pro Pro Ile Asp His Ala Leu Leu Lys Ser Leu Phe His Arg Pro
 245 250 255
 Tyr Phe His Ile Gly Val Val Ser Asp Val Ala Gly Val Ser Leu Gly
 260 265 270
 Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Val Ala Ala Gly Trp Val Val Gly
 275 280 285
 Lys Gly Trp Gly Asp Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Val Gly Leu
 290 295 300
 Leu Glu Met Val Lys Phe Gly Glu Gln Phe Phe Gly Ala Thr Ile Asn
 305 310 315 320
 Thr Arg Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 325 330 335
 Ser Cys Ser Gly Gly Arg Asn Phe Arg Cys Ala Lys Leu Ser Ile Glu
 340 345 350
 Arg Asn Gln Pro Ile Glu Lys Ile Glu Glu Thr Glu Leu Asn Gly Gln
 355 360 365
 Lys Leu Gln Gly Thr Leu Thr Ala Val Glu Val Asn Ser Phe Leu Lys
 370 375 380
 Lys Gln Gly Leu Glu Glu Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr Arg
 385 390 395 400
 Val Leu Gln Gly Thr Met Ser Val Asp Glu Ile Pro Ser Phe Ile Glu
 405 410 415
 Arg

<210> 39
<211> 999
<212> DNA
<213> Debaryomyces hansenii
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(996)
<223> coding for G3PDH (partial)
<400> 39
gga tct ggt aac tgg ggt act gct gtt gct aag atc gta tct gaa aac 48
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Val Ala Lys Ile Val Ser Glu Asn
 1 5 10 15
acg gct gaa aaa cca gaa gtg ttc gaa aag caa gtg aac atg tgg gtt 96
Thr Ala Glu Lys Pro Glu Val Phe Glu Lys Gln Val Asn Met Trp Val
 20 25 30
ttt gaa gaa gaa gtt gac gga caa aag ttg act gaa atc atc aac gcc 144
Phe Glu Glu Val Asp Gly Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Ala
 35 40 45
aaa cac gaa aac gtt aag tac ttg cca gaa gtc aag ttg ccg gaa aac 192
Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Glu Val Lys Leu Pro Glu Asn
 50 55 60
ttg gtt gca aac cca gac gtt gtc act gtc aag gat gca gac tta 240
Leu Val Ala Asn Pro Asp Val Val Asp Thr Val Lys Asp Ala Asp Leu
 65 70 75 80

♦39

tta att ttt aac att cca cat caa ttc tta cca aga gtg tgt aag caa Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Val Cys Lys Gln	85	90	95	288
ttg gtt ggc cat gtc aag cca tct gcc aga gcc atc tcc tgt ttg aag Leu Val Gly His Val Lys Pro Ser Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys	100	105	110	336
ggt ttg gaa gtt ggc cca gaa ggt tgt aag ttg tta tcg caa tct atc Gly Leu Glu Val Gly Pro Glu Gly Cys Lys Leu Leu Ser Gln Ser Ile	115	120	125	384
aac gat act tta ggt gtc cac tgt ggt gtc tta tct ggt gcc aac att Asn Asp Thr Leu Gly Val His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Ile	130	135	140	432
gcc aac gaa gtt gcc aga gaa aga tgg tct gaa acc acc att gcc tac Ala Asn Glu Val Ala Arg Glu Arg Trp Ser Glu Thr Thr Ile Ala Tyr	145	150	155	480
160				
aac att cca gaa gat ttc aga ggt aag ggt aga gat atc gac gaa tac Asn Ile Pro Glu Asp Phe Arg Gly Lys Gly Arg Asp Ile Asp Glu Tyr	165	170	175	528
gtc tta aag caa tta ttc cac aga acc tac ttc cat gtc aga gtc atc Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Thr Tyr Phe His Val Arg Val Ile	180	185	190	576
195				
aac gac atc ata ggt gct tct ttc gct ggt gct ttg aag aat gtt gtt Asn Asp Ile Ile Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val	195	200	205	624
210				
gcc tgt gct gtt ggt ttc gtt atc ggt gcc ggc tgg ggt gac aac gct Ala Cys Ala Val Gly Phe Val Ile Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Ala	215	220		672
225				
aag gcc gct atc atg aga atc ggt atc aga gaa atc atc cac ttt gcc Lys Ala Ala Ile Met Arg Ile Gly Ile Arg Glu Ile Ile His Phe Ala	225	230	235	720
240				
tct tac tac caa aag ttc ggt gtc aag ggt cca gct cca gaa tcc act Ser Tyr Tyr Gln Lys Phe Gly Val Lys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Thr	245	250	255	768
260				
act ttc act gag gaa tct gcc ggt gtc gct gac tta atc acc act tgt Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys	260	265	270	816
275				
tcc ggt ggt aga aat gtc aag gtt gct aga tac atg att gaa aac aac Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Tyr Met Ile Glu Asn Asn	275	280	285	864
290				
gtt gac gct tgg gaa gcc gaa aag att gtc tta aag ggt caa tct tct Val Asp Ala Trp Glu Ala Glu Lys Ile Val Leu Lys Gly Gln Ser Ser	290	295	300	912
305				
caa ggt atc tta act gcc aag gaa gtc cac gaa ttg tta act aac tac Gln Gly Ile Leu Thr Ala Lys Glu Val His Glu Leu Leu Thr Asn Tyr	305	310	315	960
320				
aac tta tcg aat gaa ttc cca tta ttt gaa gcc gta tac Asn Leu Ser Asn Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val	325	330		999

<210> 40

<211> 332

<212> PRT

<213> Debaryomyces hansenii

<400> 40

Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Val Ala Lys Ile Val Ser Glu Asn
1 5 10 15

Thr Ala Glu Lys Pro Glu Val Phe Glu Lys Gln Val Asn Met Trp Val
20 25 30

Phe Glu Glu Glu Val Asp Gly Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Ala
35 40 45

Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Glu Val Lys Leu Pro Glu Asn
50 55 60

Leu Val Ala Asn Pro Asp Val Val Asp Thr Val Lys Asp Ala Asp Leu
65 70 75 80

Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Val Cys Lys Gln
85 90 95

Leu Val Gly His Val Lys Pro Ser Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys
100 105 110

Gly Leu Glu Val Gly Pro Glu Gly Cys Lys Leu Leu Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Asn Asp Thr Leu Gly Val His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Ile
130 135 140

Ala Asn Glu Val Ala Arg Glu Arg Trp Ser Glu Thr Thr Ile Ala Tyr
145 150 155 160

Asn Ile Pro Glu Asp Phe Arg Gly Lys Gly Arg Asp Ile Asp Glu Tyr
165 170 175

Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Thr Tyr Phe His Val Arg Val Ile
180 185 190

Asn Asp Ile Ile Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val
195 200 205

Ala Cys Ala Val Gly Phe Val Ile Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Ala
210 215 220

Lys Ala Ala Ile Met Arg Ile Gly Ile Arg Glu Ile Ile His Phe Ala
225 230 235 240

Ser Tyr Tyr Gln Lys Phe Gly Val Lys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Thr
245 250 255

Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys
260 265 270

Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Tyr Met Ile Glu Asn Asn
275 280 285

Val Asp Ala Trp Glu Ala Glu Lys Ile Val Leu Lys Gly Gln Ser Ser
290 295 300

Gln Gly Ile Leu Thr Ala Lys Glu Val His Glu Leu Leu Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Leu Ser Asn Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val
325 330